

Untersuchungen zur Regulation des G1/S-Checkpoints

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades
eines Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Barbara Koch

aus Neustadt an der Weinstraße

Darmstadt 2010

D 17

Referent: Prof. Dr. Markus Löbrich

Koreferent: Prof. Dr. Heribert Warzecha

Tag der Einreichung: 07.10.2010

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2010

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis.....	V
II	Abbildungsverzeichnis	VIII
III	Tabellenverzeichnis.....	IX
1	Zusammenfassung / Summary	1
2	Einleitung.....	5
2.1	Strahlenphysikalische Grundlagen	5
2.1.1	Ionisierende Strahlung.....	5
2.1.2	Wechselwirkungen von Röntgenstrahlung mit Materie	6
2.1.2.1	Compton-Effekt und photoelektrischer Effekt.....	6
2.1.2.2	Biologische Strahlenwirkung	7
2.2	Auswirkungen der Röntgenstrahlung auf DNA	8
2.2.1	Einzelstrangbrüche und Basenschäden	8
2.2.2	<i>Locally Multiply Damaged Sites</i> und Doppelstrangbrüche.....	9
2.3	Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden	9
2.3.1	Erkennung von DNA-Schadenssignalen.....	10
2.3.1.1	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>	10
2.3.1.2	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related</i>	11
2.3.1.3	Weiterleitung von DNA-Schadenssignalen.....	12
2.3.2	Reparatur von DSBs	14
2.3.2.1	Nicht-Homologes End-Joining	15
2.3.2.2	Homologe Rekombination	16
2.4	Grundlagen zur UV-Strahlung	17
2.4.1	Wechselwirkungen von UV-Strahlung mit DNA und resultierende DNA-Schäden	18
2.5	Erkennung und Reparatur von UV-induzierten DNA-Schäden.....	20
2.5.1	Basen-Exzisions-Reparatur	20
2.5.2	Nukleotid-Exzisions-Reparatur	21
2.5.3	Mismatch-Reparatur.....	23
2.6	Eukaryotischer Zellzyklus und Zellzykluskontrolle	23
2.6.1	Zellzyklus.....	24
2.6.2	G1/S-Checkpoint.....	26
2.6.3	Intra-S-Phase-Checkpoint	28
2.6.4	G2/M-Checkpoint	30
2.7	Mikroskopie	31
2.7.1	DSB-Reparaturmessung mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie	31
2.7.2	<i>Live Cell Imaging</i>	32
2.7.2.1	PCNA und DNA-Ligasel als Marker zur Identifikation des G1/S-Übergangs.....	33
2.7.2.2	PCNA.....	33
2.7.2.3	DNA-Ligasel	35
2.8	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	36

3	Material und Methoden.....	38
3.1	Geräte und verwendete Materialien.....	38
3.1.1	Geräte	38
3.1.2	Verbrauchsmaterial	39
3.2	Chemikalien und Lösungen	40
3.2.1	Chemikalien	40
3.2.2	Lösungen.....	41
3.3	Antikörper	43
3.3.1	Primärantikörper	43
3.3.2	Sekundärantikörper	44
3.3.3	Plasmide	44
3.4	Kits	44
3.5	Antibiotika	44
3.6	Software.....	45
3.7	Mikrobiologische Methoden.....	45
3.7.1	Verwendete <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) Stämme.....	45
3.7.2	Nährmedium zur Anzucht von <i>E. coli</i>	45
3.7.3	Antibiotika	46
3.7.4	Anzucht und Wachstum von <i>E. coli</i>	46
3.7.5	Stammkonservierung von <i>E. coli</i>	46
3.7.6	Transformation von <i>E. coli</i>	46
3.7.6.1	Herstellung kompetenter Zellen	46
3.7.6.2	Transformation von <i>E. coli</i>	47
3.8	Molekularbiologische Methoden	48
3.8.1	Plasmid-Minipräparation aus <i>E. coli</i>	48
3.8.2	Plasmid-Maxipräparation aus <i>E. coli</i>	48
3.9	Proteinanalytische Methoden.....	49
3.9.1	Ernte und Lyse der Zellen zur Gewinnung von Gesamtprotein.....	49
3.9.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	50
3.9.3	Western Blot.....	51
3.10	Zellbiologische Methoden.....	52
3.10.1	Zelllinien.....	52
3.10.2	Kultivierung der Zellen.....	53
3.10.3	Bestimmung der Zellzahl	54
3.10.4	Steriles Einfrieren von Zellen	54
3.10.5	Auftauen von Zellen.....	55
3.10.6	Transfektion der Zellen.....	55
3.10.6.1	Chemische Transfektion mit Effectene Transfektions-Reagenz (QIAGEN)	55
3.10.6.2	Elektroporation von 82-6hTert-Zellen.....	56
3.10.7	Bestrahlung der Proben.....	57
3.10.7.1	Bestrahlen mit ionisierender Strahlung	57
3.10.7.2	Bestrahlung mit UVC	57
3.10.8	Behandlung von Zellen mit Inhibitor	58
3.10.9	Überlebensexperimente	58

3.11	Immunfluoreszenz-Färbung	59
3.11.1	Fixierung	59
3.11.1.1	Methanol-Fixierung.....	59
3.11.1.2	Formaldehyd-Fixierung	60
3.11.2	Färbung.....	60
3.11.2.1	Färbung mit PCNA zur Identifizierung von S-Phase-Zellen	61
3.11.2.2	Identifizierung von G1- und G2-Phase-Zellen	62
3.11.2.3	γ -H2AX-Färbung.....	62
3.11.2.4	53BP1-Färbung	63
3.11.2.5	53BP1- und PCNA-Doppelfärbung.....	63
3.11.2.6	Anti-Phospho H3-Färbung zur Untersuchung des G2/M-Checkpoints	64
3.12	Methoden zur Untersuchung des G1/S-Übergangs.....	65
3.12.1	Serumentzug als Methode zur Bestimmung des G1/S-Übergangs	65
3.12.2	BrdU/EdU-Doppelmarkierung als Methode zur Untersuchung des G1/S-Übergangs.....	65
3.12.2.1	BrdU-Markierung von Zellen	65
3.12.2.2	EdU-Markierung von Zellen.....	66
3.12.2.3	Doppelmarkierung mit BrdU und EdU	66
3.12.2.4	Fixierung und Färbung von BrdU und EdU	66
3.12.2.5	Doppelmarkierung BrdU und EdU mit γ -H2AX.....	67
3.12.2.6	Fixierung und Färbung von BrdU und EdU mit γ -H2AX	67
3.12.3	Untersuchungen mittels Durchflusszytometer	68
3.12.3.1	BrdU-Markierung und Fixierung der Zellen für die Durchflusszytometrie.....	69
3.12.3.2	Färbung der Zellen für die Durchflusszytometrie	69
3.12.3.3	Messung und Auswertung der Zellen.....	69
3.12.4	<i>Live Cell Imaging</i>	70
3.12.4.1	GFP-53BP1 und RFP-Ligasel.....	71
3.12.4.2	Aufnahme der Zellen	71
3.12.4.3	Auswertung des G1/S-Phase-Übergangs.....	71
3.12.4.4	Bestimmung des Mitotischen Index.....	72
4	Ergebnisse.....	73
4.1	Charakterisierung des G1/S-Checkpoints in der lebenden Zelle.....	73
4.1.1	Das <i>Live Cell Imaging</i> -System: Versuche in der lebenden Zelle	73
4.1.1.1	Aufbau eines LCI-Systems	74
4.1.1.2	Etablierung des S-Phase-Markers RFP-Ligasel	77
4.1.1.3	Untersuchung des G1/S-Checkpoints in U2OS-Zellen mittels LCI	79
4.1.1.4	Etablierung einer Methode zur Messung von DSB-Reparatur und G1/S-Checkpoint in humanen Fibroblasten mittels LCI	80
4.1.1.5	Etablierung der Transfektion.....	81
4.1.1.6	Etablierung von GFP-53BP1 als DSB-Marker	82
4.1.2	Reparaturmessungen im LCI-System mittels GFP-53BP1-Foci	83
4.1.3	Zeitliche Regulation und Sensitivität des G1/S-Checkpoints mittels LCI	86
4.1.4	Entwicklung des Schadenslevels in der S-Phase nach Bestrahlung in der G1-Phase	90
4.2	Charakterisierung des G1/S-Checkpoints mittels Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz-Mikroskopie	97

4.2.1	G1/S-Checkpoint-Messung nach IR mittels Durchflusszytometrie.....	97
4.2.2	G1/S-Checkpoint-Messung mittels PCNA in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie	101
4.2.3	Messung des G1/S-Checkpoints mittels EdU/BrdU-Doppelfärbung	105
4.3	Beurteilung des Schadenslevels in der frühen S-Phase	106
4.4	Mechanistische Studien: Anteile von ATR und ATM bei der Checkpoint-Induktion	108
4.4.1	Überprüfung des Protein-Status von ATM und ATR mittels Western Blot	108
4.4.2	Überlebensexperimente mit 82-6hTert und F02-98hTert-Zellen nach IR und UVC.....	110
4.4.3	Messung des G1/S-Checkpoints nach IR und UVC-Bestrahlung über EdU/BrdU-Markierung	113
4.4.4	Messung des G1/S-Checkpoints nach IR mittels Durchflusszytometrie.....	116
4.4.5	Messung des G1/S-Checkpoints in synchronisierten Zellen nach UVC-Bestrahlung.....	121
4.4.6	γ -H2AX-Signal in synchronisierten G1-Phase-Zellen nach UVC-Bestrahlung	124
4.4.7	Induktion des G2/M-Checkpoints nach UVC-Bestrahlung und IR	125
4.4.8	Induktion des G2/M-Checkpoints nach UVC-Bestrahlung und IR und Zugabe von ATM-Inhibitor	127
4.4.9	Bedeutung von γ -H2AX im Zusammenhang mit ATM und ATR und dessen Checkpoint-Funktion nach UVC-Bestrahlung	130
5	Diskussion.....	132
5.1	Untersuchung des G1/S-Checkpoints nach IR.....	132
5.1.1	Untersuchungen zum Einsetzen des G1/S-Checkpoints	133
5.1.2	Der <i>Restriction Point</i>	139
5.1.3	Das Aufheben des G1/S-Checkpoints	140
5.1.4	Sensitivität des G1/S-Checkpoints	142
5.1.5	Verfolgung von GFP-53BP1-Foci durch die S-Phase	145
5.2	Die Checkpoint-Regulation nach UVC-Bestrahlung.....	148
5.2.1	Die zeitliche Regulation des G1/S-Checkpoints nach UVC-Bestrahlung.....	149
5.2.2	H2AX-Phosphorylierung von UVC-bestrahlten G1-Phase Zellen	155
5.2.3	Die Rolle von p53 bei der Induktion des G1/S-Checkpoints nach UVC-Bestrahlung.....	156
5.2.4	Der G2/M-Checkpoint nach UVC-Bestrahlung	157
5.2.5	Induktion von γ -H2AX in UVC-bestrahlten G2-Phase-Zellen	160
5.3	Ausblick.....	162
6	Literaturverzeichnis	164
7	Anhang	180
8	Lebenslauf	186
9	Publikationen und Tagungsbeiträge	187
	Danksagung.....	188
	Eidesstattliche Erklärung	189

I Abkürzungsverzeichnis

6-4PPs	6-4-Photoprodukte
°C	Grad Celsius
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
Art	Artemis
AT	<i>Ataxia Telangiectasia</i>
ATCC	<i>American Type & Culture Collection</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATMi	ATM-Inhibitor
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ATM and Rad3 related</i>
ATRIP	<i>ATR Interacting Protein</i>
BAA	Bis-Acrylamid
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
Bp	Basenpaar
Bq	Becquerel (Einheit der Radioaktivität)
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Fötales Kälberserum)
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
c	Geschwindigkeit
Cdk	<i>Cyclin dependent Kinase</i>
CENP-F	Centromer-Protein F
Chk 1/2	<i>Cell Cycle Checkpoint Kinase 1/2</i>
cm	Zentimeter
CPDs	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere
Da	Dalton
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNA-PK _{CS}	katalytische Untereinheit der DNA-PK
DNA-PKi	DNA-PK-Inhibitor
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridin
ERG	Eppendorf-Reaktions-Gefäß
ESB	DNA-Einzelstrangbruch
eV	Elektronenvolt

FA	Formaldehyd
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (Fötales Kälberserum)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
G0-Phase	Ruhephase der Zelle
G1-Phase	erste gap-Phase im Zellzyklus
G2-Phase	zweite gap-Phase im Zellzyklus
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (Grün-fluoreszierendes Protein)
Gy	Gray (Einheit der Strahlendosis)
h	Stunde
H ₂ O dest.	destilliertes Wasser
HR	Homologe Rekombination
hTert	<i>human telomerase reverse transcriptase</i>
IFM	Immunfluoreszenz-Mikroskopie
IR	<i>Ionizing Radiation</i> (Ionisierende Strahlung)
Kan	Kanamycin
Kb	Kilobasenpaare
keV	Kiloelektronenvolt
kg	Kilogramm
L	Liter
LB	Luria-Bertani
LCI	<i>Live Cell Imaging</i> (Lebendzell-Mikroskopie)
Lig IV	Ligase VI
LMDS	<i>Locally multiply damaged site</i>
m	milli/Meter
Mb	Megabase
M-Phase	Mitosephase
M	Molar, Mol pro Liter
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MeV	Megaelektronenvolt
MI	Mitotischer Index
MilliQ	doppelt destilliertes Wasser
min	Minute
ml	Milliliter
MMR	Mismatch-Reparatur
MRN-Komplex	Mre11-Rad50-Nbs1-Komplex
Mw	Molekulargewicht
NBS	<i>Nijmegen Breakage Syndrome</i>
NEAA	<i>Non Essentiell Amino Acids</i> (Nicht-essentielle Aminosäuren)
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NHEJ	Nicht-homologes End-Joining
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
P/S	Penicillin-Streptomycin

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphatgepufferte Saline)
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PI	Propidiumiodid
Rb	Retinoblastoma Protein
RBW	Relative Biologische Wirksamkeit
res.	resistent
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Reaktive Sauerstoff-Spezies)
RPA	<i>Replication Protein A</i> (Replikationsprotein A)
rpm	<i>rounds per min</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
S-Phase	Synthesephase
SSA	<i>Single Strand Annealing</i>
ssDNA	<i>single strand DNA</i> (Einzelstrang-DNA)
Sv	Sievert (Einheit der Äquivalentdosis)
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TxR	TexasRed
ÜN	über Nacht
V(D)J	<i>Variable (Diversity) Joining</i>
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumenprozent)
vgl.	vergleiche
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewichtsprozent)
WT	Wildtyp
x g	Erdbeschleunigung
XRCC	<i>X-ray Repair Cross-Complementing</i>
Z	Ordnungszahl
α	alpha
β	beta
δ	delta
η	eta
λ	lambda (Wellenlänge)
μ	mikro
u	Frequenz
ϕ	phi
γ	gamma

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Compton-Effekt und photoelektrischer Effekt	7
Abb. 2: Organisation der essentiellen Komponenten nach Auftreten eines DNA-Schadens.....	10
Abb. 3: Erkennung und Weiterleitung von DNA-Schadenssignalen.....	14
Abb. 4: Schematischer Ablauf des NHEJ	16
Abb. 5: Schematischer Ablauf der HR	17
Abb. 6: Das elektromagnetische Spektrum.....	18
Abb. 7: Strukturformeln des Grundgerüsts von CPDs und 6-4PPs.....	20
Abb. 8: Schematischer Ablauf der Nukleotid-Exzisions-Reparatur	22
Abb. 9: Regulation des Zellzyklus über Cyclin-Cdk-Komplexe.....	25
Abb. 10: Schematischer Ablauf zur Einleitung des G1/S-Checkpoints.....	27
Abb. 11: Schematische Darstellung der Aktivierung von ATM und ATR nach DSBs in der S- Phase.....	29
Abb. 12: Dreidimensionale Struktur von PCNA (<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>).....	34
Abb. 13: Zellzyklus-abhängige Verteilung von PCNA	35
Abb. 14: Auswertung von <i>DotPlots</i> im Durchflusszytometer	70
Abb. 15: Komponenten des <i>Live Cell Imaging</i> -Systems	75
Abb. 16: Stündliche Aufnahme einer mit RFP-Ligasel transfizierten U2OS-Zelle	77
Abb. 17: Mitotischer Index von U2OS-Zellen.....	78
Abb. 18: Progression von U2OS-Zellen aus der G1-Phase in die S-Phase	79
Abb. 19: Mitotischer Index von transfizierten 82-6hTert-Zellen	81
Abb. 20: Kolokalisation von GFP-53BP1, γ -H2AX- und 53BP1-Foci in der Immunfluoreszenz.....	82
Abb. 21: Reparaturkinetik transfizierter und untransfizierter 82-6hTert-Zellen	83
Abb. 22: DSB-Reparaturmessungen mittels LCI und Immunfluoreszenz-Mikroskopie in 82- 6hTert-Zellen nach IR.....	84
Abb. 23: Vergleich zwischen Auszählung der DSBs am Mikroskop und am Bildschirm.....	85
Abb. 24: 82-6hTert-Zelle transfiziert mit RFP-Ligasel und GFP-53BP1 im Übertritt von G1- Phase in S-Phase	87
Abb. 25: Progression von Zellen aus der G1-Phase in die S-Phase im LCI-System.....	88
Abb. 26: Entwicklung der DSBs nach Bestrahlung mit 1 Gy in der G1-Phase und beim Übergang zur S-Phase	89
Abb. 27: Anzahl von GFP-53BP1-Foci bei S-Phase-Eintritt der Zellen	90
Abb. 28: Entwicklung der Anzahl von DSBs nach Bestrahlung mit 1 Gy im Verlauf der S-Phase.....	90
Abb. 29: Verfolgung von GFP-53BP1-Foci durch die S-Phase	92
Abb. 30: LCI-Aufnahme der GFP-53BP1-Entwicklung in einer einzelnen bestrahlten Zelle während der S-Phase	93
Abb. 31: Zeitliche Entwicklung strahlen- und replikationsassoziierter GFP-53BP1-Foci in der S- Phase.....	94
Abb. 32: Zeitliche Entwicklung strahlen- und replikationsassoziierter Foci nach Behandlung mit DNA-PK-Inhibitor	96
Abb. 33: Repräsentative <i>DotPlots</i> von BrdU-markierten 82-6hTert-Zellen	98
Abb. 34: Durchflusszytometrische Quantifizierung BrdU-negativer S-Phase-Zellen nach IR	100
Abb. 35: Kolokalisation von BrdU und PCNA	102
Abb. 36: Quantifizierung von S-Phase-Zellen anhand des PCNA-Musters.....	102

Abb. 37: Darstellung des PCNA-Musters nach Immunfluoreszenz-Färbung in verschiedenen Abschnitten der S-Phase	103
Abb. 38: Quantitative Analyse des Anteils früher, mittlerer und später S-Phase-Zellen an der gesamten Zellpopulation mittels PCNA	104
Abb. 39: EdU/BrdU-Doppelfärbung zur Messung des G1/S-Checkpoints.....	105
Abb. 40: G1/S-Checkpoint Messung mittels EdU/BrdU-Doppelmarkierung.....	106
Abb. 41: Färbung mit EdU/BrdU zur Markierung der S-Phase und γ -H2AX zur Identifizierung von DSBs	107
Abb. 42: Western Blot zum Nachweis der Proteine ATM und ATR.....	109
Abb. 43: Exemplarische Darstellung der Kolonien der Überlebensexperimente mit 82-6hTert-Zellen nach IR und UVC-Bestrahlung	111
Abb. 44: Überlebensexperimente mit 82-8hTert- und F02-98hTert-Zellen nach IR und UVC-Bestrahlung.....	112
Abb. 45: Messung des G1/S-Checkpoints über EdU/BrdU-Markierung nach IR.....	114
Abb. 46: Messung des G1/S-Checkpoints über EdU/BrdU-Markierung nach UVC-Bestrahlung	115
Abb. 47: Durchflusszytometrische Analyse des G1/S-Checkpoints nach IR.....	117
Abb. 48: Durchflusszytometrische Analyse des G1/S-Checkpoints nach UVC-Bestrahlung	118
Abb. 49: Auswertung BrdU-positiver S-Phase-Zellen nach UVC-Bestrahlung mittels Durchflusszytometrie.....	120
Abb. 50: Analyse des G1/S-Checkpoints in synchronisierten Zellen nach UVC-Bestrahlung und Zugabe von ATM-Inhibitor.....	123
Abb. 51: Einsetzen des G2/M-Checkpoints nach IR und UVC-Bestrahlung	126
Abb. 52: Untersuchung des G2/M-Checkpoints nach ATM-Inhibitor und IR.....	128
Abb. 53: Untersuchung des G2/M-Checkpoints nach ATM-Inhibitor und UVC-Bestrahlung	129
Abb. 54: γ -H2AX-Foci nach IR und UVC-Bestrahlung in der G2-Phase.....	131
Abb. 55: Übersichtsbilder der γ -H2AX Phosphorylierung nach 0 h.....	181
Abb. 56: Übersichtsbilder der γ -H2AX Phosphorylierung nach 2 h.....	183
Abb. 57: Übersichtsbild einer unbestrahlten Kultur von 82-6hTert-Zellen	184
Abb. 58: Übersichtsbild einer mit UVC bestrahlten Kultur von 82-6hTert-Zellen	185

III Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme von <i>E. coli</i>	45
Tab. 2: Zusammensetzung LB-Medium.....	45
Tab. 3: Zur Selektion von <i>E. coli</i> verwendete Antibiotika	46
Tab. 4: Zusammensetzung Puffer 1.....	46
Tab. 5: Zusammensetzung Puffer 2.....	47
Tab. 6: Polyacrylamidgel (7 %)	51
Tab. 7: Sammelgel	51
Tab. 8: Primäre Antikörper.....	60
Tab. 9: Sekundäre Antikörper	61
Tab. 10: Anzahl GFP-53BP1-Foci in der S-Phase	91
Tab. 11: Unbestrahlte G1-Phase-Zellen	124
Tab. 12: UV-bestrahlte G1-Phase-Zellen nach 12 J/m ² und 18 h	124
Tab. 13: UV-bestrahlte G1-Phase-Zellen nach 12 J/m ² und 24 h	125

1 Zusammenfassung / Summary

Für die Erhaltung der genomischen Integrität ist das Zusammenspiel von Zellzykluskontrolle und DNA-Reparatur nach Auftreten von Doppelstrangbrüchen (DSBs) oder andersartigen Schäden wesentlich. Um der Zelle Zeit zur Reparatur der DNA-Schäden zur Verfügung zu stellen, werden Checkpoints zur Verlangsamung oder Inhibierung der Proliferation induziert. Es wurde beobachtet, dass der G2/M-Checkpoint eher insensitiv gegenüber DSBs ist und Zellen vor Abschluss der Reparatur in die Mitose entlässt. Der G1/S-Checkpoint ist dagegen als ein sehr sensibler Checkpoint beschrieben, der als sogenannter „Master-Checkpoint“ über eine weitere Proliferation oder einen dauerhaften G1-Arrest der Zellen entscheidet. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der G1/S-Checkpoint nach ionisierender Strahlung (IR) auf zellulärer Ebene genauer charakterisiert werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde daher zunächst die zeitliche Regulierung des G1/S-Checkpoints und die Sensitivität in Bezug auf DSBs untersucht. Mit der neu etablierten Methode der Lebendzellmikroskopie oder des „*Live Cell Imagings*“ können Zeitrafferaufnahmen lebender Zellpopulationen erstellt werden. Die Transfektion humaner Fibroblasten mit GFP-53BP1 erlaubte die Quantifizierung von DSBs, während anhand der unterschiedlichen nukleären Lokalisation von RFP-Ligase die Abgrenzung von G1- zu S-Phase-Zellen erfolgte. Mit Hilfe dieser Methode wurde gezeigt, dass in der G1-Phase mit 1 Gy bestrahlte Zellen innerhalb der ersten 6 h mit 10 bis 16 DSBs in die S-Phase progressierten, bis der G1/S-Checkpoint voll einsetzte. Die Verfolgung einzelner GFP-53BP1-Foci durch die S-Phase führte zu dem Ergebnis, dass strahleninduzierte DSBs im Laufe der S-Phase größtenteils repariert wurden. Gleichzeitig konnte die Entstehung und der kontinuierliche Anstieg replikationsassoziierter DSBs während der S-Phase beobachtet werden.

Zur Verifizierung dieser überraschenden Ergebnisse wurde mittels fixierter Zellen und „klassischer“ Methoden, wie Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz-Mikroskopie, nach Bestrahlung von G1-Zellen ebenfalls die Dauer bis zum Einsetzen eines G1-Arrests bestimmt. Dabei zeigte sich, dass es während der ersten Stunden auch nach hohen Dosen nur zu einer Verlangsamung beim Eintritt in die S-Phase kommt. Ein vollständiger G1-Arrest trat erst 4 h bis 6 h nach Bestrahlung ein. Die gleichzeitige Messung der γ -H2AX-Foci als Marker für DSBs zeigte, dass bis zu diesem Zeitpunkt Zellen, unabhängig von der Bestrahlungsdosis, mit unreparierten DSBs in die S-Phase gelangten. Nach dem Einsetzen zeigte sich der Checkpoint allerdings sehr sensitiv. Die Dauer des Arrests war hierbei abhängig von der Bestrahlungsdosis, und der Arrest wurde erst wieder aufgehoben, wenn die Zellen nur noch wenige DSBs aufwiesen.

Die bisherigen Ergebnisse zur Charakterisierung des G1/S-Checkpoints zeigten verschiedene Limitierungen auf, die mit der Vorstellung eines „Master-Checkpoints“ zumindest im ersten Zellzyklus nach Bestrahlung nicht unbedingt vereinbar sind. Das langsame Einsetzen des G1/S-Checkpoints deutete auf eine ineffektive DSB-Schadensantwort hin und warf die Frage nach den molekularen Mechanismen auf. Daher wurde im zweiten Teil der Arbeit die Regulation des G1/S-Checkpoints nach Modifikation des DNA-Schadens und der somit aktivierten Schadensantwort untersucht. Während nach IR DSBs induziert werden, deren Detektion vornehmlich über ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) verläuft, entstehen durch die Bestrahlung mit kurzwelligem (254 nm), monochromatischem UVC-

Licht vor allem Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs) und 6-4-Photoprodukte (6-4PPs) an der DNA. Im Zuge der Reparatur entstehen einzelsträngige Bereiche, welche als Aktivierungs-Signal von ATR dienen könnten. Um die Abhängigkeit des Checkpoints von ATM und ATR zu untersuchen, wurde neben einer WT-Zelllinie auch eine ATM- und ATR-defiziente Zelllinie eingesetzt. Zum direkten Vergleich der Regulation nach IR und UVC-Bestrahlung wurden ebenfalls die Methoden der Durchflusszytometrie und der Immunfluoreszenz-Mikroskopie verwendet.

Exponentiell wachsende Zellen arretierten im Gegensatz zu IR nach UVC-Bestrahlung direkt am G1/S-Übergang. Zudem war keine Abhängigkeit von ATM und ATR erkennbar. Da auch S-Phase-Zellen sofort nach UVC-Bestrahlung arretierten, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Induktion des G1/S-Checkpoints eventuell von Intra-S-Phase-Checkpoints und/oder mechanischer Inhibierung beeinflusst wurde. Dies sollte durch die Bestrahlung von synchronisierten Zellen in der frühen G1-Phase umgangen werden. Nach Stimulation und Bestrahlung der Zellen ergab sich keine direkte Abhängigkeit des G1/S-Checkpoints von ATR, und es waren nur leichte Effekte von ATM erkennbar. Die erhaltenen Daten sprechen für die Beteiligung einer oder mehrerer weiterer Komponenten, die im *Signaling* des G1/S-Checkpoints involviert sind.

Da bekannt ist, dass der G2/M-Checkpoint im Gegensatz zum G1/S-Checkpoint nach IR sehr schnell einsetzt, wurde abschließend dessen Abhängigkeit von ATM und ATR nach IR und UVC-Bestrahlung untersucht, um eventuelle Unterschiede im Signaling der beiden Checkpoints aufzudecken. Erwartungsgemäß konnte in ATM-profizienten Zellen nach IR, sowie in ATR-profizienten Zellen nach UVC-Bestrahlung innerhalb einer Stunde ein G2/M-Checkpoint induziert werden. Die ATR-defiziente Zelllinie wies nach UVC-Bestrahlung ein geringes, fluenzabhängiges Einsetzen des Checkpoints auf. Bei Inhibierung von ATM wurde nach IR in allen Zelllinien ein vollständiges Aufheben des Checkpoints beobachtet, während dies nach UVC-Bestrahlung nur in ATR-defizienten Zellen beobachtet werden konnte. Diese Ergebnisse gaben Grund zur Annahme, dass nach UVC-Bestrahlung sowohl ATR als auch ATM an einem *Signaling* zur Induktion des G2/M-Checkpoints nach UVC-Bestrahlung beteiligt sind.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nach UVC-Bestrahlung ein von ATM und ATR abhängiger G2/M-Checkpoint innerhalb einer Stunde beobachtet werden. Nach den unerwarteten Ergebnissen eines langsam einsetzenden G1/S-Checkpoints nach IR wurde nach UVC-Bestrahlung ein schnell einsetzender G1/S-Checkpoint nachgewiesen, bei dem keine direkte ATR-Abhängigkeit und eine leichte ATM-Abhängigkeit festgestellt wurden. Ob allerdings weitere Faktoren zur vollständigen Initialisierung vonnöten sind, muss in folgenden Arbeiten geklärt werden.

After the appearance of DNA double-strand breaks (DSBs) or other lesions, the coordinated interplay between cell cycle control and DNA repair is essential for the maintenance of the genomic integrity. To provide time for the repair of the DSBs, activated checkpoints slow down or halt the cell cycle progression of the cells. It has been observed that the G2/M checkpoint is insensitive to DSBs and releases cells into mitosis before DSB repair has been completed. In contrast, the G1/S checkpoint is described to be very sensitive and is assumed to be a “master checkpoint” which decides whether a cell should divide or undergo a permanent cell cycle arrest. So, this work addresses the characterization of the G1/S checkpoint on the cellular level after ionizing radiation (IR).

The first part of the work deals with the temporal regulation of the G1/S checkpoint and the sensitivity with regard to DSBs. The new established method of Live Cell Imaging allows the observation of living cells over long time periods. Transfection of human fibroblasts with constructs encoding for GFP-53BP1 allows the quantification of DSBs. The discrimination of G1 and S phase cells was done by the different pattern of co-transfected RFP-LigaseI. By means of this method, a progression of irradiated cells into the S phase with 10-16 DSBs could be demonstrated within the first 6 h until the activation of the G1/S checkpoint. Tracing of single DSBs uncovered that during S phase IR-induced DSBs are repaired for the most part. Simultaneously, a continuous increase of replication-associated DSBs could be observed during S phase.

By using fixed cells and “classical” methods like flow-cytometry and immunofluorescence-microscopy, these astonishing results could be verified. During the first hours only a slowing of S phase entry occurs even after high doses and a full G1 arrest only takes place 4 h to 6 h after IR. The simultaneous measurement of γ -H2AX-foci as a DSB-marker demonstrates that during this time cells enter S phase with unrepaired DSBs and that this process is dose-independent. But once activated, the G1/S checkpoint is very sensitive. The duration of the arrest depended on the irradiation dose and the arrest was not abrogated until cells have repaired nearly to background level.

These results uncovered different limitations of the G1/S checkpoint, which are not compatible with the association of a “master checkpoint” – at least in the first cell cycle after irradiation. The slow activation of the G1/S checkpoint points to an ineffective DSB damage response and it raises the question for the molecular mechanisms. Thus, in the second part of this work the regulation of the G1/S checkpoint after modification of the DNA damage and the activated damage response was investigated. While IR induces DSBs which are detected by ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), short-wave (254 nm), monochromatic UVC-light induces Cyclobutan-Pyrimidin-Dimers (CPDs) and 6-4-Photoproducts (6-PPs). In the course of repair ssDNA regions are created which might serve as a signal for the activation of ATR. To investigate the dependency of the G1/S checkpoint on ATM and ATR, additional to wt cells, an ATM-deficient and an ATR-deficient cell line were used in the experiments. For the direct comparison with IR, the methods of flow-cytometry and immunofluorescence-microscopy were utilized. In contrast to IR, after UVC-irradiation a G1/S checkpoint arrest of exponential growing cells was immediately detected. Furthermore, no dependency of the checkpoint on ATM and ATR was detectable. Because of the immediate arrest of S phase cells after UVC-irradiation, it could not be excluded that the induction of the G1/S checkpoint is probably affected by Intra-S checkpoints or mechanical inhibition of replication forks. To exclude these possibilities,

synchronized G1 phase cells were irradiated directly after release. In these cells no direct dependency on ATR and only little effects of ATM could be identified. These data indicate an additional involvement of one or multiple factors in the signaling of the G1/S checkpoint.

As it is known, the G2/M checkpoint is in contrast to the G1/S checkpoint activated within 1 h after IR. So finally its dependency on ATM and ATR was investigated after IR and UVC-irradiation. As expected, a G2/M checkpoint could be induced in ATM-proficient cells after IR and in ATR-proficient cells after UVC. The ATR-deficient cell line showed a marginal fluence-dependent activation of the checkpoint after UVC-irradiation. After IR, ATM-inhibition lead to a complete abrogation of the G2/M checkpoint indicating a G2/M checkpoint solely on ATM. Interestingly, after UVC-irradiation ATM-inhibition lead to a weaker G2/M checkpoint induction in wt cells and to a complete checkpoint abrogation in ATR-deficient cells. This demonstrates that both kinases, ATM and ATR, are involved in G2/M checkpoint regulation after UVC-treatment.

Summarizing, a G2/M checkpoint dependency of ATM and ATR could be detected within an hour after UVC-irradiation. After the unexpected results of a slowly activated G1/S checkpoint after IR, a fast induced G1/S checkpoint could be detected after UVC-irradiation, without direct dependency of ATR and only a low dependency of ATM. The participation of additional components for entire checkpoint activation has to be verified in further studies.

2 Einleitung

2.1 Strahlenphysikalische Grundlagen

Jeder Mensch ist zeit seines Lebens der Belastung durch radioaktive Strahlung ausgesetzt. Sie kommt natürlich, in Form von kosmischer Strahlung und Bodenstrahlung vor, kann aber auch im Rahmen medizinischer Anwendungen künstlich erzeugt werden. Selbst niedrige Dosen dieser ionisierenden Strahlung (IR) können zur Krebsentstehung führen oder Schäden an Immun- und Nervensystem zur Folge haben.

Die Strahlenbiologie beschäftigt sich mit der Wechselwirkung von IR mit dem Organismus, die sich dabei sowohl systemisch, als auch auf Organe, Gewebe, Zellen und Moleküle auswirkt. Bedingt werden diese Auswirkungen durch Wechselwirkung der organischen Materie mit IR, die auf molekularer Ebene zu Veränderungen und Schäden an der DNA und Proteinen führen. Auf zellulärer und subzellulärer Ebene werden Zellmembranen, Zellkern, Chromosomen und Mitochondrien geschädigt. Die Folgen hiervon zeigen sich in einem veränderten Zellzyklus und der Entartung von Zellen, wodurch Krebs entstehen kann. Gewebe und Organe werden in ihrer Funktionsweise gestört, was letztendlich zu Mutationen in der Keimbahn führt, die an folgende Generationen weitergegeben werden können.

2.1.1 Ionisierende Strahlung

Allgemein versteht man unter Strahlung den Transport von Energie ohne Masse. Strahlung kann als elektromagnetische Welle (em) oder Teilchenstrahlung auftreten. Die Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit Materie wird meist über das Teilchenmodell erklärt (Welle-Teilchen-Dualismus). Darin wird jedem Strahlungsquant (Photon) die Energie $E = h \cdot f$ zugeordnet (Quantentheorie).

Von besonderem Interesse für die Strahlenbiologie ist IR, welche bei der Wechselwirkung mit Materie deren Atome und Moleküle anregt und ionisiert. Generell wird auch IR in Teilchenstrahlung, zu denen α -Strahlung (Heliumkerne), β^- -Strahlung (Elektronen) und β^+ -Strahlung (Positronen) zählen und in em-Strahlung, zu der kurzwellige UV-Strahlung (siehe Kapitel 2.4), Röntgen- und γ -Strahlung gehören, aufgeteilt. Die beiden letztgenannten Strahlungsarten bestehen aus energiereichen (kurzwelligen) Photonen. Dabei unterscheidet man Röntgen- und γ -Strahlung durch die Art ihrer Entstehung. γ -Strahlung ist eine Begleiterscheinung beim radioaktiven Zerfall, wobei ein Atomkern durch Aussenden von Photonen nach einem Zerfallsprozess von einem angeregten in einen stabilen Zustand übergeht. Demgegenüber wird Röntgenstrahlung durch die Wechselwirkung beschleunigter Elektronen mit Materie z.B. in Röntgenröhren erzeugt (Kiefer und Kiefer, 2003, Hall und Gaccia, 2006).

2.1.2 Wechselwirkungen von Röntgenstrahlung mit Materie

Bei der Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit Materie kommt es zu Stoßprozessen, bei denen ein Strahlungsquant mit bestimmter Energie und Impuls auf ein Elektron der Atomhülle trifft. Dabei bleibt die Bilanz der Energie und des Impulses des Systems vor und nach dem Stoß erhalten. Es ergeben sich je nach Energie des eintreffenden Photons und Stärke der Elektronenbindung im Atom verschiedene Wechselwirkungsprozesse. Bei der klassischen Streuung ändert das eintreffende Quant zwar seine Richtung, überträgt aber keine Energie. Ein weiterer Prozess ist die Paarbildung. Hier wird das Strahlungsquant zu einem Elektron-Positron-Paar materialisiert. Die Summe der kinetischen Energien der beiden Teilchen entspricht der Quantenenergie abzüglich ihrer Ruheenergie. Auf den Compton-Effekt und den photoelektrischen Effekt wird im Folgenden eingegangen (Hall und Gaccia, 2006, Kiefer und Kiefer, 2003).

2.1.2.1 Compton-Effekt und photoelektrischer Effekt

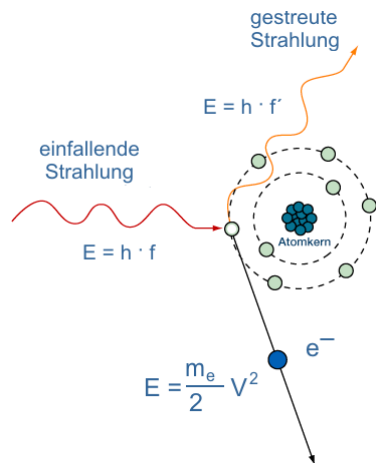
Welcher Effekt bei der Wechselwirkung von Röntgenstrahlung mit Materie auftritt, wird von der Energie der Strahlung (Beschleunigungsspannung) und dem absorbierenden Stoff bestimmt (Abb. 1). Jedes Elektron eines jeden Stoffes hat eine eigene, charakteristische Bindungsenergie, welche von der Größe des Atoms oder Moleküls und der betreffenden Schale des abzulösenden Elektrons abhängt. Ist die Energie des eintreffenden Photons deutlich größer als die Bindungsenergie des Hüllenelektrons auf das es trifft, kommt es zum Compton-Effekt. Hierbei wird ein Teil der Energie des Photons auf das Elektron übertragen, das Sekundärelektron wird aus der Atomhülle gelöst und besitzt eine kinetische Energie, welche der übertragenen Energie abzüglich der Bindungsenergie entspricht. Das Photon selbst wird gestreut (abgelenkt). Da es einen Teil seiner Energie abgegeben hat, besitzt das Photon nach der Streuung eine größere Wellenlänge. Auf seiner weiteren Bahn durch das absorbierende Material kann das abgelenkte Photon weitere Ionisationen hervorrufen, solange seine Energie noch ausreichend groß ist.

Im Gegensatz dazu gibt beim photoelektrischen Effekt ein Photon seine gesamte Energie an das abzulösende Elektron ab. Die kinetische Energie des Sekundärelektrons entspricht der Energie des Photons abzüglich der Bindungsenergie.

Abgelöste Elektronen auf inneren Schalen hinterlassen eine Lücke, die durch Elektronen äußerer Schalen aufgefüllt werden. Dies entspricht einer Verringerung der potentiellen Energie, deren Differenz als emittiertes Photon ausgeglichen wird (charakteristische elektromagnetische Strahlung).

Die beim Compton- oder photoelektrischen Effekt abgelösten Sekundärelektronen besitzen meist eine ausreichend große Energie, um in dem Material weitere Ionisationen oder Anregungen auszulösen. Daher wird die biologische Wirkung von Röntgenstrahlung nicht nur von den Photonen selbst, sondern auch von den herausgeschlagenen Sekundärelektronen bestimmt (Hall und Gaccia, 2006, Kiefer und Kiefer, 2003).

A



B

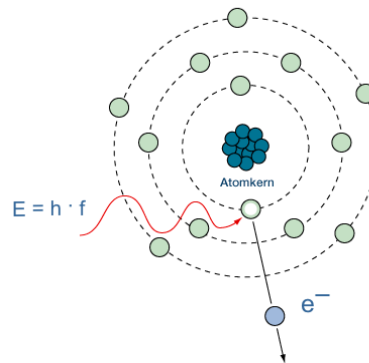


Abb. 1: Compton-Effekt und photoelektrischer Effekt

(A) Beim Compton-Effekt wird ein Elektron durch ein Photon der Energie $E = h \cdot f$ (E = Energie; f = Frequenz; h = Konstante) aus dem Atomverbund herausgeschlagen. Ein Teil der Energie wird als kinetische Energie auf das Elektron übertragen, das gestreute Photon enthält noch die Energie $E = h \cdot f'$. Der Compton-Effekt nimmt umgekehrt proportional mit der Energie ab und proportional mit der Kernladungszahl zu.

(B) Beim photoelektrischen Effekt wird ein Elektron aus dem Atomverband durch ein Photon der Energie $E = h \cdot f$ herausgeschlagen. Die Energie des Photons wird dabei vollständig auf das Elektron übertragen (www.onmeda.de/lexika/strahlenmedizin).

2.1.2.2 Biologische Strahlenwirkung

Da die biologische Wirkung ionisierender Strahlung im Wesentlichen auf Ionisationen im biologischen Material (z.B. DNA) beruht, wurden physikalische Größen zur quantitativen Erfassung dieser Wirkung eingeführt. Quantitativ wird dies durch die sogenannte Energiedosis D beschrieben. Die Energiedosis ist definiert als die in einem Volumenelement der Masse m von der Strahlung an die Materie übertragene (absorbierte) Energie E :

$$D = \frac{E}{m} \quad [D] = 1 \frac{J}{kg} = 1 Gy$$

Die Einheit der Energiedosis ist 1 Gray (Gy). Eine alte Einheit für die Energiedosis ist Rad (rd oder rad), wobei 1 Gy 100 rad entspricht.

Da für die biologische Wirkung von ionisierender Strahlung weniger die aufgenommene Energie der Materie eine Rolle spielt, sondern vielmehr der Grad der Schädigung des Organismus, wurde zusätzlich der Begriff der Äquivalentdosis eingeführt. Die Verteilung der Ionisationen im bestrahlten Material ist abhängig von der Art der ionisierenden Strahlung. So ist α -Strahlung gleicher Energiedosis biologisch wirksamer als Röntgenstrahlung. Um diesem Phänomen Rechnung zu tragen, wird die Energiedosis mit dem so genannten Qualitätsfaktor q multipliziert und die dabei entstehende Größe als Äquivalentdosis H bezeichnet.

$$H = q \cdot D \quad [H] = 1 \frac{J}{kg} = 1 Sv$$

Um die Äquivalentdosis von der Energiedosis zu unterscheiden, wurde ihr eine eigene Einheit, Sievert (Sv), zugewiesen. Zur messtechnischen Ermittlung dieser Relativen Biologischen Wirksamkeit (RBW) legte das *National Bureau of Standards* 1954 die RBW folgendermaßen dar: Die RBW einer Teststrahlung (r) verglichen mit Röntgenstrahlung (250 kV *x-rays*) ist definiert durch das Verhältnis von D_{250}/D_r , wobei D_{250} und D_r den Dosen der Teststrahlung und der Röntgenstrahlung entsprechen, um den gleichen biologischen Effekt zu erreichen.

2.2 Auswirkungen der Röntgenstrahlung auf DNA

Der Zellkern, insbesondere die DNA, wurde schon früh als die Komponente der Zelle erkannt, die am sensitivsten auf Bestrahlung reagiert. Die biologischen Effekte reichen von direktem Zelltod über Mutationen der DNA bis zu Karzinogenese. Bei der biologischen Wechselwirkung von ionisierender Strahlung mit DNA unterscheidet man eine direkte und eine indirekte Strahlenwirkung. Bei der direkten Strahlenwirkung wirkt ein Photon oder Sekundärelektron direkt auf die DNA und ionisiert deren Atome oder regt sie an. Dies ist vorwiegend bei dicht ionisierender Strahlung der Fall. Demgegenüber wechselwirkt die ionisierende Strahlung bei der indirekten Strahlenwirkung mit Atomen oder Molekülen der Zelle in der Nähe der DNA, wobei sich Radikale bilden können. Diese reagieren in einem zweiten Schritt mit der DNA (Radikalkettenreaktion) und schädigen sie dabei.

Ionisierende Strahlung induziert eine große Anzahl verschiedener Schäden in der DNA. Nach Bestrahlung mit 1 Gy ionisierender Strahlung können in der Zelle 4000-5000 DNA-Schäden festgestellt werden. Am häufigsten vertreten sind Basenschäden (1000-3000/Zelle) und Einzelstrangbrüche (ESBs) (1000/Zelle). Die Anzahl der Doppelstrangbrüche (DSBs) liegt nach dieser Dosis bei etwa 20-30 pro Zelle (Ward, 1988, Löbrich *et al.*, 1995, Rogakou *et al.*, 1998, Dahm-Daphi *et al.*, 2000).

2.2.1 Einzelstrangbrüche und Basenschäden

Im Falle eines ESBs ist das Zuckerphosphat-Rückgrat der DNA auf einer Seite unterbrochen. Diese Art von Brüchen kann über Basen-Exzisions-Reparatur (BER) schnell und effizient repariert werden, da der gegenüberliegende, intakte DNA-Strang als Template genutzt wird. ESBs können in mehrere Klassen eingeteilt werden. Solche, die durch eine Spaltung der Phosphodiesterbindung entstanden sind, zählen zur Klasse I. Zu Klasse II werden ESBs gezählt, welchen eine Phosphatgruppe fehlt oder weitere Zucker oder Basen verändert sind. Klasse III beinhaltet ESBs mit veränderten Zuckern oder Basen, wobei auch die Phosphatgruppe fehlen kann. ESBs mit Verlust des vollständigen Nukleotids zählen zur Klasse IV (Obe *et al.*, 1992). Von Bedeutung werden ESBs, wenn sie benachbart zu anderen Schäden, z.B. Basenschäden oder weiteren ESBs auftreten. Damit können sie Teil komplexer DNA-Schäden werden.

Basenschäden können sowohl durch direkte Ionisationen als auch durch $\bullet\text{OH}$ - und Peroxyl-Radikale (indirekte Strahlenwirkung) entstehen. Durch ultraviolette (UV)-Strahlung (Kapitel 2.4) entstehen ebenfalls Basenschäden, wie 8-oxo-Guanin und Pyrimidin-Dimere (z.B. Cyclobutan-Pyrimidin-

Dimere und 6-4-Photoproducte). Diese wiederum können zu ESBs führen und werden ebenfalls über BER repariert.

2.2.2 *Locally Multiply Damaged Sites* und Doppelstrangbrüche

Treten innerhalb eines begrenzten Bereichs von bis zu 10 Basenpaaren mehrfach Schäden am Zuckerphosphat-Rückgrat oder Basenschäden in der DNA auf, bezeichnet man diese Stellen als *Locally Multiply Damaged Sites* (LMDS). Dieser Begriff wurde von Ward geprägt (Ward, 1985) und beschreibt die Entstehung von LMDS, wenn „spurs“ und „blobs“ in der Nähe der DNA auftreten. „Spurs“ und „blobs“ sind örtlich begrenzte Ansammlungen von Radikalen, welche auf den Umstand zurückgeführt werden können, dass die Energie der Röntgenstrahlung nicht homogen an die Materie abgegeben wird. Sowohl die Photonen der Röntgenstrahlung als auch die entstandenen Sekundärelektronen deponieren ihre Energie in Paketen entlang von Bahnschritten durch die Materie. „Spurs“ besitzen einen Durchmesser im Bereich von 4 nm, enthalten 2 bis 3 Ionenpaare und haben eine deponierte Energie von bis zu 100 eV. „Blobs“ erreichen einen Durchmesser von etwa 7 nm und enthalten 12 Ionenpaare. Ihre deponierte Energie reicht von 100 bis 500 eV (Mozumder und Magee, 1966, Hall, 2000).

DSBs zählen ebenfalls zu den LMDS. Im Gegensatz zum ESB sind beim DSB beide Zucker-Phosphat-Stränge der DNA unterbrochen. Dabei können beide Stränge auf gleicher Höhe gebrochen (glatter Bruch) oder die Brüche um einige Basenpaare versetzt sein (überlappender Bruch). DSBs zählen zu den schwerwiegendsten Läsionen für Zellen. Nicht korrekte Reparatur kann zu Mutationen, chromosomalen Aberrationen und der Entstehung von Krebs führen (Zhang *et al.*, 2007). Schon ein DSB kann für einen Organismus tödlich sein, sofern ein essentielles Gen betroffen ist (Khanna und Jackson, 2001). Es wird angenommen, dass täglich bis zu 10 DSBs spontan entstehen können, z.B. endogen durch Reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS), die als Nebenprodukt der Atmungskette auftreten (Wei, 1998, Haber, 2000, Ma *et al.*, 2005). DSBs können auch exogen durch ionisierende Strahlung (Ward, 1990) oder chemische Agenzien entstehen (Hall und Tilby, 1992). Die Entstehung von DSBs konnte auch bei mechanischem Stress auf die Chromosomen nachgewiesen werden. Ebenso können ESBs die Entstehung von DSBs begünstigen, sobald Replikationsgabeln auf sie treffen (Khanna und Jackson, 2001). DSBs werden andererseits gezielt in Zellen induziert, um einen Austausch zwischen homologen Chromosomen während der Meiose zu erreichen und so eine Vergrößerung der genetischen Diversität zu erhalten. Dies ist bei der V(D)J-Rekombination (*Variable diversity joining*) bei der Bildung der Antikörperdiversität der Fall (Gellert, 2002).

2.3 Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden

Das wesentliche Ziel einer Zelle ist die Erhaltung ihrer genomischen Integrität, um die Entstehung von Krebs durch Mutationen in der DNA zu vermeiden. Nach Auftreten von DSBs in der DNA wird daher die DNA-Schadensantwort eingeleitet. Zeit zur Reparatur wird durch Aktivierung von Check-

points am Übergang der Zellzyklus-Phasen zur Verfügung gestellt, um die Proliferation der Zellen in Gegenwart von DSBs zu unterbinden. Verschiedene Reparaturmechanismen beseitigen in der Folge die DSBs. Ist die Schädigung zu schwerwiegend und somit irreparabel, kommt es zur Apoptose der Zellen.

Dem Prozess der DNA-Schadensantwort liegt eine Signaltransduktionskaskade zugrunde (Abb. 2). Die Zelle erkennt die Schäden zunächst über Sensor-Proteine. Das Signal wird durch Transducer-Proteine verstärkt und an Effektor-Proteine weitergeleitet (Shiloh, 2003).

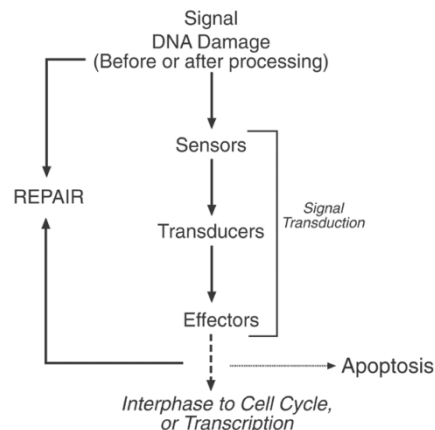


Abb. 2: Organisation der essentiellen Komponenten nach Auftreten eines DNA-Schadens

Nach Auftreten eines DNA-Schadens (Signal) wird dieser durch Sensoren wahrgenommen, über Transducer weitergeleitet und gelangt schließlich zu den Effektoren, die je nach Schwere des Schadens die Reparatur oder die Apoptose der Zelle einleiten (Iliakis *et al.*, 2003).

2.3.1 Erkennung von DNA-Schadenssignalen

ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) und ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related*) sind Serin/Threonin-Kinasen und Mitglieder der Phosphatidylinositol 3-Kinase-ähnlichen Proteinkinasen (PIKK). Sie sind an einer Vielzahl regulatorischer Vorgänge beteiligt, inklusive der Signalweiterleitung von DNA-Schäden und der Kontrolle des Zellzyklus über die Aktivierung von Checkpoints (Brown *et al.*, 1999, Cortez *et al.*, 1999, Goodship *et al.*, 2000, Shiloh, 2006). Die Mechanismen der initialen Aktivierung von ATR und ATM sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Bei der Aktivierung von ATM werden als Signale Veränderungen in der Chromatinstruktur durch einen DSB diskutiert, und auch der MRN-Komplex spielt eine Rolle. Die Aktivierung von ATR erfolgt über Bereiche einzelsträngiger DNA nach einem DNA-Schaden. Der Verlust dieser beiden Kinasen führt zu Chromosomen-Instabilitätssyndromen.

2.3.1.1 *Ataxia Telangiectasia Mutated*

Das Gen ATM befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 11 q22-23. Das ATM-Protein ist eine Kinase mit einem Molekulargewicht von etwa 370 kDa. Obgleich ATM zur Familie der PIKK-Kinasen zählt, phosphoryliert es jedoch nicht Lipide, wie andere Vertreter dieser Familie, sondern Proteine (Savitsky *et al.*, 1995). Charakteristisch für ATM und weitere Vertreter der PIKK-Familie sind 5 Domänen innerhalb des Proteins. Am N-terminalen Ende befinden sich zunächst die HEAT- und FAT-Domänen, dann die hochkonservierte Kinase-Domäne. Es folgt die PRD (*PIKK Regulatory Domain*)- und schließlich die C-Terminale FATC-Domäne. Während die HEAT-Domäne direkt Nbs1

bindet, interagiert die FAT-Domäne mit der Kinase-Domäne von ATM, um den C-Terminus des Proteins zu stabilisieren. Die Aktivität der Kinase-Domäne wird über die PRD- und FATC-Domänen reguliert (Lempiäinen und Halazonetis, 2009). Nach dem Auftreten von DSBs spielt ATM eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus sowie der DNA-Reparatur (Kastan und Lim, 2000) (Abb. 3). Nach Auftreten eines DSBs ist ATM somit eines der ersten Proteine, welches aktiviert wird. ATM liegt im inaktiven Zustand als Dimer vor, wobei jeweils die Kinase-Domäne durch die FAT-Domäne der Monomere blockiert wird. Die Aktivierung erfolgt durch gegenseitige Phosphorylierung in der FAT-Domäne, worauf das inaktive Dimer in zwei aktive Monomere zerfällt (Bakkenist und Kastan, 2003, Falck *et al.*, 2005, Warmerdam und Kanaar, 2010). Die aktiven Monomere binden an Nbs1, einer Untereinheit des MRN-Komplexes. ATM wird daraufhin an den DSB rekrutiert und eine Checkpoint-Antwort wird induziert. Substrate von ATM, die an der Induktion des G1/S-Checkpoints involviert sind, sind p53, Mdm2 (*Mouse double minutes 2-Protein*) und Chk2. Bei Aktivierung des Intra-S-Checkpoints sind unter anderem BRCA1 (*Breast Cancer Susceptibility Gene 1*) und Nbs1 (*Nijmegen breakage syndrome 1*) vertreten, bei Aktivierung des G2/M-Checkpoints gehören zu den Substraten BRCA1 und Rad17.

Mutationen im ATM-Gen führen zu einem Chromosomen-Instabilitätssyndrom und liegen dem Krankheitsbild der *Ataxia telangiectasia* (AT) zugrunde (Gatti *et al.*, 1988). AT ist eine autosomal rezessive Erkrankung mit einem sehr komplexen klinischen Krankheitsbild. Hier sind progressive Neurodegeneration, Immundefizienz, erhöhtes Tumorrisiko, genomische Instabilität und erhöhte Strahlensensitivität zu nennen. Erstmals wurde die Erkrankung 1941 durch Denise Louis Bar beschrieben. Der Begriff AT wurde von Boder (1975) aufgrund der gestörten Koordination von Bewegungsabläufen (Ataxie) und der Erweiterung der oberflächlichen Hautgefäße (Telangiektasien) bei den Patienten geprägt. Die Häufigkeit der Erkrankung wird weltweit auf 1:40000 geschätzt, die Anzahl der Heterozygoten in den USA und Europa wird mit ca. 1-1,5 % angegeben (Savitsky *et al.*, 1995).

Auf zellulärer Ebene zeigen sich Auswirkungen des AT-Syndroms bei der DNA-Reparatur, in Checkpoint-Defekten, vermehrt auftretenden Chromosomenbrüchen und instabilen Telomeren (Kastan und Lim, 2000). Zudem zeichnen sich die Zellen durch eine erhöhte Sensitivität gegenüber Strahlung aus (Hannan *et al.*, 2002). Die aufgrund der Mutationen des ATM-Genes auftretende Anhäufung von DNA-Schäden bedingt eine Destabilisierung des Genoms, weshalb bei den betroffenen Patienten eine hohe Krebsdisposition vorliegt.

2.3.1.2 *Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related*

ATR ist, wie auch ATM, eine Protein-Kinase und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 220 kDa. Ebenso wie ATM weist ATR die für die PIKK-Familie typischen Domänen innerhalb des Proteins auf. Die Aktivierung von ATR erfolgt beim Auftreten vielfältiger Typen von DNA-Schäden über einzelsträngige DNA-Bereiche, die mit RPA beladen werden. Hierzu zählen blockierte Replikationsgabeln nach ESBs, Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren oder 6-4-Photoprodukten z.B. durch ROS oder UV-Strahlung. Es konnte nachgewiesen werden, dass ATR nach Bestrahlung mit UV ähnliche Substrate phosphoryliert wie ATM nach Bestrahlung mit IR, darunter p53, Rad17, Nbs1 und H2AX (Abb. 3)

(Burma *et al.*, 2001). Man erkennt somit eine starke Überlappung zwischen ATM und ATR im *Downstream-Signaling* (Shechter *et al.*, 2004, Matsuoka *et al.*, 2007). Nach IR werden DSBs induziert, die ATM-abhängig resektiert werden. Schließlich erfolgt die Rekrutierung von ATR über ATRIP an den DNA-Schaden in Abhängigkeit vom MRN-Komplex, was in einer Chk1-Phosphorylierung resultiert (Adams *et al.*, 2006). ATRIP als Bindungspartner von ATR ist ebenfalls ein essentielles Protein im Checkpoint-Pathway (Cortez *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu wird ATR an Orte blockierter Replikationsgabeln und UV-Schäden unabhängig von ATM rekrutiert. Die Phosphorylierung und Aktivierung von ATM als Antwort auf UV-Bestrahlung oder Blockierung von Replikationsgabeln ist dabei ATR-abhängig (Stiff *et al.*, 2006).

ATR ist auf Chromosom 3 q22-24 lokalisiert und es wurde bereits in Mäusen gezeigt, dass das Protein essentiell für das Überleben ist. Der Verlust führt zu einer frühen embryonalen Lethalität. Hypomorphe Mutationen beim Menschen hingegen führen zu einer verminderten Expression von ATR. Dies resultiert im so genannten Seckel-Syndrom, einer autosomal-rezessiven Funktionsstörung, die sich in einem niedrigen Geburtsgewicht, schwerer Mikroenzephalie und fehlgestaltetem Erscheinungsbild des Gesichts mit fliehender Stirn, hervortretender Nase und abnormal kleinem Kiefer äußert. Außerdem ist das Körperwachstum schon im Uterus gehemmt, was sich später in einer kleinen Statur manifestiert. Die Patienten zeigen ebenfalls geistige Retardierung. ATR ist somit essentiell für die Entwicklung (O'Driscoll *et al.*, 2003, Shechter *et al.*, 2004). Auf zellulärer Ebene äußert sich der Verlust von ATR in einer erhöhten Sensitivität gegenüber IR und UV-Bestrahlung sowie einem Verlust der Checkpoint-Kontrolle (Wright *et al.*, 1998).

2.3.1.3 Weiterleitung von DNA-Schadenssignalen

Die Induktion von DNA-Schäden, vor allem von DSBs kann strukturelle Veränderungen der Chromatinstruktur zur Folge haben. Diese Strukturänderungen können einen Teil der zellulären Antwort auf DNA-Schäden darstellen. Über ATP-abhängige Komplexe wird das Chromatin derart umgestaltet, dass die Histone H2A, H2B, H3 und H4 für weitere Prozesse der DNA-Schadensantwort zugänglich sind. Es folgt eine kovalente Modifikation der Histone durch Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung oder Ubiquitinierung. Eine wichtige Histonmodifikation nach IR und der Induktion von DSBs zur Weiterleitung des Schadenssignals ist die Phosphorylierung von H2AX zu γ -H2AX. H2AX selbst wird mit einem Anteil von etwa 10 % der Histon-Familie H2A als Mitglied "X" zugeordnet (West und Bonner, 1980) und besitzt eine hochkonservierte Aminosäure-Sequenz am C-terminalen Ende des Histons, welche als SQE (Serin, Glutamin, Glutaminsäure)-Motiv bezeichnet wird (Mannironi *et al.*, 1989). Das Serin liegt in Säugerzellen an Position 139. Die Phosphorylierung nach einem DNA-Schaden an Serin 139 erfolgt über die Mitglieder der PIKK-Familie ATM, ATR und DNA-PK. Die phosphorylierte Form des H2AX lässt sich bereits eine Minute nach Exposition gegenüber ionisierender Strahlung nachweisen, nach zehn Minuten ist die maximale Phosphorylierung erreicht. Somit ist das Auftreten von γ -H2AX einer der frühesten Schritte bei der Antwort auf DSBs. Dabei bleibt diese Histonmodifikation nicht auf die direkte Umgebung des DSBs begrenzt, sondern wird über Rückkopplung auf einen Bereich von 2 Mb um den Bruch ausgedehnt (Rogakou *et al.*, 1998, Stiff *et al.*, 2004).

Dieses Ereignis dient als Plattform für die Rekrutierung von zusätzlichen Komponenten der Checkpoint-Signalkaskade, wodurch Checkpoint-Signaling und DSB-Reparatur verstärkt werden (Macurek *et al.*, 2010). γ -H2AX-Foci kolokalisieren mit Proteinen, welche ebenfalls an der DNA-Schadensantwort beteiligt sind und an DSBs akkumulieren (Abb. 3). Hierzu zählen unter anderem 53BP1 (*p53 Binding Protein*), BRCA1 und MDC1 (*Mediator of DNA Damage Checkpoint 1*) (Paull *et al.*, 2000, Goldberg *et al.*, 2003, Bekker-Jensen *et al.*, 2006). MDC1 scheint ein früher Regulator der DNA-Schadensantwort zu sein, womit diesem Protein eine Schlüsselrolle bei der Rekrutierung und der Retention von Faktoren der DNA-Schadensantwort zufällt. MDC1 wiederum interagiert direkt mit dem MRN-Komplex (Mre11-Rad50-Nbs1), durch welchen ATM gebunden und aktiviert wird (Stucki *et al.*, 2005). Andere Autoren gehen in diesem Punkt allerdings davon aus, dass ATM selbst die Veränderung der Chromatinstruktur nach einem DSB erkennt und eine Autophosphorylierung stattfindet. Dies steigert erneut die DNA-Schadensantwort, da nun weitere aktive ATM-Moleküle an den Bruch zusammengezogen werden und dadurch erneut H2AX ATM-abhängig phosphoryliert werden kann (Bakkenist und Kastan, 2003, Lou *et al.*, 2006). Ein weiterer Faktor, der ähnlich schnell wie MDC1 an γ -H2AX rekrutiert wird, ist die Ubiquitin-Ligase RNF8 mit ihrem Regulator RNF168. Über eine FHA (*forkhead-associated*)-Domäne bindet RNF8 an phosphoryliertes MDC1. Es wurde gezeigt, dass die RNF8-vermittelte Ubiquitinierung von Histonen zur weiteren Rekrutierung von *Downstream*-Faktoren beiträgt. So akkumulieren schließlich BRCA1 und 53BP1 (Mailand *et al.*, 2007, van Attikum und Gasser, 2009).

Neben ionisierender Strahlung führt auch die Bestrahlung mit UVB (Halicka *et al.*, 2005) und blockierte Replikationsgabeln infolge eines Replikations-Arrestes zur Entstehung von γ -H2AX (Ward und Chen, 2001). Ein weiterer, noch nicht vollständig geklärter Aspekt ist die Rolle der ATR-Kinase bei der H2AX-Phosphorylierung nach UV-Bestrahlung und das Vorkommen der γ -H2AX-Foci in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus. In einigen Arbeiten wurde nach UV-Bestrahlung keine H2AX-Phosphorylierung in den Zellen beobachtet (Rogakou *et al.*, 1998, Burma *et al.*, 2001, Limoli *et al.*, 2002). Andere Annahmen beruhen darauf, dass die H2AX-Phosphorylierung über DSBs vermittelt wird, die dadurch entstehen, dass Replikationsgabeln mit UV-induzierten DNA-Schäden kollidieren (Ward *et al.*, 2001, Ward *et al.*, 2004, Zhao *et al.*, 2010). Kürzlich wurde gezeigt, dass UV-induzierte H2AX-Phosphorylierung auch außerhalb der S-Phase auftreten kann, allerdings ist der Mechanismus für diese replikationsunabhängige Induktion noch nicht aufgeklärt. Es wird davon ausgegangen, dass die Nukleotid-Exzisions-Reparatur an diesem Vorgang beteiligt ist (Halicka *et al.*, 2005, Marti *et al.*, 2006, Stiff *et al.*, 2006, Matsumoto *et al.*, 2007).

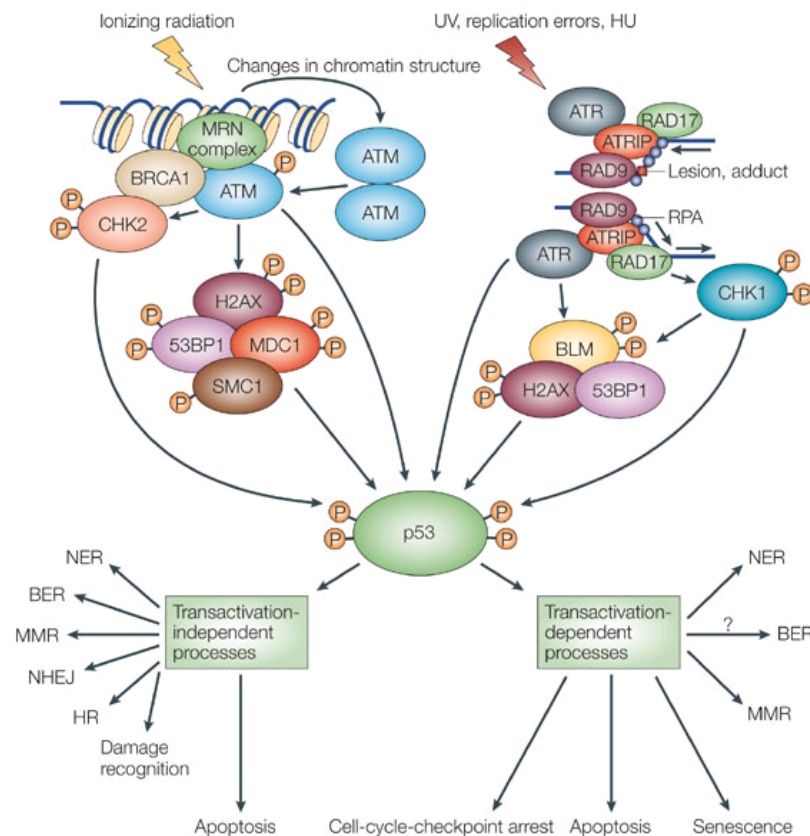


Abb. 3: Erkennung und Weiterleitung von DNA-Schadenssignalen

Ionisierende Strahlung verursacht unter anderem DSBs, die über ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) erkannt werden (Signalweg linke Seite). Nach Autophosphorylierung von ATM erfolgt dessen Spaltung in aktive Monomere, die an den DNA-Schaden rekrutiert werden. An der Schadensstelle sitzt der MRN-Komplex, bestehend aus Mre11 (*Meiotic recombination-11*), RAD50 und Nbs1 (*Nijmegen breakage syndrome-1*) und BRCA1 (*Breast-Cancer-Susceptibility Protein-1*). H2AX (Histone-2A Familie, Mitglied X), 53BP1 (*p53-binding protein-1*) und MDC1 (*Mediator of DNA-damage Checkpoint protein-1*) werden durch ATM phosphoryliert und leiten das Signal an p53 weiter.

Der Komplex aus ATR und ATRIP (*Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related* und *ATR Interacting Protein*) spielt in der Erkennung von UV-Schäden in der DNA oder unter Replikations-Stress eine große Rolle (Signalweg rechte Seite). Die Anlagerung von ATR-ATRIP an die geschädigte, meist einzelsträngige DNA erfolgt über RPA (*Replication Protein A*). Der Rad9-Rad1-Hus1-Komplex (Rad9) und Rad17 erleichtern die Erkennung des Schadens. BLM (*Bloom Syndrome Protein*) und H2AX werden über Chk1 und ATR phosphoryliert. Ebenso erfolgt die Phosphorylierung von Chk1 und Chk2 über ATR und ATM und die Weiterleitung des Schadenssignals an Effektor-Proteine wie p53. p53 leitet die Antwort auf den DNA-Schaden ein: Zellzyklus-Arrest, DNA-Reparatur über verschiedene Reparaturwege (NER (Nukleotid-Exzisions-Reparatur), BER (Basen-Exzisions-Reparatur), MMR (Mismatch-Reparatur), NHEJ (Nicht-Homologes End-Joining) und HR (Homologe Rekombination)), Apoptose oder Seneszenz (Sengupta und Harris, 2005).

2.3.2 Reparatur von DSBs

Die DNA einer Zelle ist ständig den direkten oder indirekten Einflüssen von Stoffwechselvorgängen oder -produkten ausgesetzt, die ihre molekulare Struktur verändern und zur Ausbildung von DSBs führen können (Friedberg *et al.*, 1995). Umwelteinflüsse wie natürliche und künstliche ionisierende Strahlung können ebenso wie chemische Agenzien DSBs induzieren. Zum Großteil sind diese unerwünscht, da sie die Grundlage von Mutationen darstellen und zur Krebsentstehung beitragen können (Lindahl und Nyberg, 1974, Rydberg und Lindahl, 1982, Nakamura *et al.*, 1998). DSBs werden aber auch endogen bei physiologischen Prozessen gezielt induziert z.B. im Rahmen der V(D)J-

Rekombination während der B- und T-Zellreifung (Gellert *et al.*, 1999, Schrader *et al.*, 2005) und während der Meiose, um den Austausch homologer Chromosomen zu ermöglichen (Neale *et al.*, 2006).

Die Reparatur von DSBs erfolgt in erster Linie über zwei Mechanismen: Das Nicht-Homologe End-Joining (NHEJ) und die Homologe Rekombination (HR). Beim NHEJ erfolgt die direkte Verknüpfung zweier getrennter Enden meist unabhängig von der Sequenz der DNA (Weterings und van Gent, 2004). Nachteilig beim NHEJ sind die relativ häufig vorkommenden Fehlverknüpfungen und Deletionen während der Reparatur (Odersky *et al.*, 2002, Helleday *et al.*, 2007). Die HR hingegen ist ein fehlerfreier Reparaturprozess, bei welchem fehlende Sequenz-Informationen an der Schadensstelle unter Verwendung einer homologen Sequenz, vorzugsweise diejenige des Schwesterchromatides, neu synthetisiert werden.

2.3.2.1 Nicht-Homologes End-Joining

Das NHEJ benötigt keine oder nur sehr kurze Abschnitte von etwa 1 bis 6 Basenpaaren homologer DNA, um eine Reparatur einzuleiten (Helleday *et al.*, 2007). Das Prinzip des NHEJ beruht auf der einfachen Verknüpfung der beim DSB entstandenen freien DNA-Enden (Abb. 4). Die Genauigkeit dieser Reparatur ist meist ausreichend für einfache, glatte Brüche (van Heemst *et al.*, 2004). Die Reparatur über NHEJ erfolgt in allen Zellzyklus-Phasen. In der G₀- als auch der G₁-Phase ist das NHEJ der Hauptreparaturweg (Odersky *et al.*, 2002). In der S-Phase werden replikationsunabhängige DSBs über NHEJ repariert, aber auch in der G₂-Phase wird ein Teil der dortigen DSBs über diesen Weg repariert. DSBs, die 3'- oder 5'-Überhänge aufweisen, können nicht sofort ligiert werden, sondern müssen zunächst prozessiert werden. Verkürzungen der Überhänge können über eine Polynukleotid-Kinase im Zusammenwirken mit XRCC4 oder der Artemis-Nuklease zum Schneiden von „hairpin“-Strukturen erfolgen. Ebenso besitzt das Protein Mre11 als Teil des MRN-Komplexes sowohl Endonuklease- als auch 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (Zha *et al.*, 2009). Das darauffolgende Auffüllen der Enden übernehmen die DNA-Polymerasen μ und λ (Ma *et al.*, 2002, Koch *et al.*, 2004, Nick McElhinny *et al.*, 2005). Die Einleitung der Reparatur erfolgt durch die Bindung des Heterodimers Ku70/Ku80 innerhalb der ersten 30 min nach Auftreten des Schadens an der DNA an die freien DNA-Bruchenden (Walker *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 2001), wodurch eine Degradation der DNA verhindert wird. Gleichzeitig wird die katalytische Untereinheit (DNA-PK_{cs}) der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) rekrutiert. Befinden sich die Bruchenden in räumlicher Nähe, erfolgt die Autophosphorylierung von DNA-PK_{cs} (Reddy *et al.*, 2004). Die abschließende Ligation der Bruchenden erfolgt durch den XRCC4/DNA-LigaseIV/XLF-Komplex (Nick McElhinny *et al.*, 2000, Buck *et al.*, 2006).

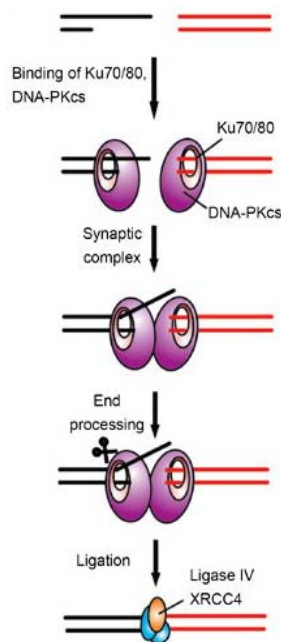


Abb. 4: Schematischer Ablauf des NHEJ

Das NHEJ benötigt keine oder nur sehr kurze homologe Bereiche zur Reparatur von DSBs. Der Bruch wird durch das Heterodimer Ku70/Ku80 erkannt und die katalytische Untereinheit der DNA-PK_{cs} zum Bruch rekrutiert. Nach Prozessierung der Bruchenden erfolgt die Ligation über den XRCC4/DNA-LigaseIV-Komplex (Weterings und Chen, 2008).

2.3.2.2 Homologe Rekombination

Anders als beim NHEJ ist bei der Reparatur von DSBs durch die HR eine homologe Sequenz erforderlich (Abb. 5). Meist erfüllt diese Aufgabe die Schwesterchromatide, wodurch die Reparatur hauptsächlich in der späten S- und der G2-Phase des Zellzyklus stattfindet (Sung und Klein, 2006). Rad51 und seine Paraloge Rad52, die Rad54-Helikase und das BRCA2-Tumorsuppressorprotein vermitteln die Reparatur über HR.

Die HR wird über Resektion der DNA-Bruchenden eingeleitet. An der Erkennung und der Resektion der Bruchenden ist der MRN-Komplex beteiligt. Er bindet an die DNA und resektiert durch 5'-3' Exonuklease-Aktivität überstehende, einzelsträngige Enden (Lavin, 2004, Wyman und Kanaar, 2006). Zusätzlich interagiert das Protein CtIP mit dem MRN-Komplex, welches ebenfalls die Aktivierung von ATR und den Ablauf der HR fördert (Sartori *et al.*, 2007, Nakamura *et al.*, 2010). Ob CtIP möglicherweise selbst DNA-Enden resektiert oder nur zusammen mit dem MRN-Komplex aktiv ist, wird zurzeit noch diskutiert.

Im weiteren Ablauf bindet RPA an die einzelsträngigen DNA-Bereiche und stabilisiert diese. Anschließend ersetzt BRCA2 RPA durch Rad51, wodurch die Bildung eines Nukleoprotein-Filaments aus einzelsträngiger DNA und Rad51 erfolgt. Daraufhin kommt es zur Stranginvasion in den DNA-Doppelstrang der Schwesterchromatide (Baumann *et al.*, 1996). Hierzu wird Rad51 mittels BRCA1, BRCA2 und Rad52 an den einzelsträngigen DNA-Bereich gebracht (Sugiyama und Kowalczykowski, 2002, Ting und Lee, 2004). Dieser Prozess könnte durch einen Komplex aus BRCA2 und Rad51 vermittelt werden (Pellegrini *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 2002). Rad52 bindet an die einzelsträngigen DNA-Enden, worauf deren Degradation verhindert wird. Rad51 bewirkt gemeinsam mit Rad54 die Stranginvasion in einen homologen, intakten DNA-Abschnitt und die Anlagerung an die homologe Sequenz, was zur Bildung einer Holliday-Junction führt. Ausgehend von den 3'-Enden findet schließlich die Neusynthese des fehlenden DNA-Abschnitts mit homologer Sequenz als Matrize statt. Neuere

Studien gehen davon aus, dass die Polymerase η an der Verlängerung des DNA-Strangs beteiligt ist (McIlwraith *et al.*, 2005). Als abschließender Schritt erfolgt die Auflösung der Holliday-Junction durch Helikasen und Resolvasen.

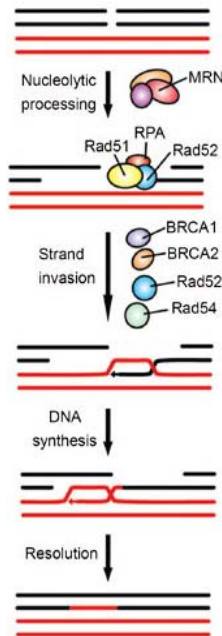


Abb. 5: Schematischer Ablauf der HR

Zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen über HR wird eine homologe DNA-Sequenz benötigt, die meist auf der Schwesterchromatide zu finden ist. Der DSB wird zunächst durch den MRN-Komplex erkannt und überhängende, einzelsträngige DNA-Enden prozessiert. An diese einzelsträngigen Bereiche lagern sich Rad51, Rad52 und RPA. Anschließend erfolgt die Strandinvasion über Rad52, Rad54, BRCA1 und BRCA2 in den homologen Bereich der Schwesterchromatide, welcher als Template für die Neusynthese des DNA-Bereichs um den DSB verwendet wird. Nach Synthese wird die entstandene Holliday-Junction aufgelöst und die neu synthetisierten Bereiche ligiert (Weterings und Chen, 2008).

2.4 Grundlagen zur UV-Strahlung

Die Entdeckung der UV-Strahlung und ihrer Eigenschaften war ein stufenweiser Prozess, der sich über drei Jahrhunderte erstreckte. Bahnbrechende Beobachtungen wurden unter anderem 1614 von Sala gemacht, der feststellte, dass Sonnenlicht Silbernitrat-Kristalle schwarz färbt, oder von Scheele im Jahr 1777, der eine Schwarzfärbung von Silberchlorid-Lösung im Sonnenlicht beobachtete. Eine genauere Beschreibung dieser Ergebnisse erfolgte von Ritter 1801. Er stellte fest, dass unsichtbare Strahlen am violetten Ende des Lichtspektrums am effektivsten waren, um das Silberchlorid zu schwärzen. Ein Durchbruch im Bereich der Photophysik wurde 1865 erreicht. Maxwell stellte die Theorie auf, dass Licht und Schall Teil eines größeren Energiespektrums mit wellenartigen Eigenschaften sind. 1882 wurde diese Theorie von Hertz bestätigt, dem es gelang, Mikrowellen zu messen. Dies war der erste Beweis für die Existenz von Strahlung jenseits des UV-Bereichs, des sichtbaren Lichts und des Infrarot-Spektrums. In diesem Feld wurden Anfang des 20. Jahrhunderts weitere Entdeckungen gemacht. 1900 stellte Planck die Theorie auf, dass Strahlung aus kleinen Energiepaketen, Quanten genannt, besteht, welche Einstein 1905 als masselose Energieteilchen (Photonen) bezeichnete. Diese werden durch die Absorption von Licht von Atomen und Molekülen freigesetzt. 1913 stellte Bohr die Behauptung auf, dass Elektronen Lichtenergie absorbieren und sie bei jener Wellenlänge wieder emittieren, welcher der Energie der Elektronen entspricht. Von Schrödinger wurde 1926 die Theorie entwickelt, Elektronen eher als Wellen denn als Teilchen zu behandeln.

Werden die Wellenlängen ausgehend von γ - und Röntgenstrahlung im elektromagnetischen Spektrum größer, kommt man in den Bereich der ultravioletten- oder UV-Strahlung, womit Licht der Wellenlänge zwischen 90 und 400 nm bezeichnet wird (Abb. 6). Man unterscheidet einen kurzwelligen Bereich (100-295 nm; UVC), einen Bereich mit mittlerer Wellenlänge (295-320 nm; UVB) und einen langwelligen Bereich (320-400 nm; UVA). Die Angaben der genauen Wellenlängen der Bereiche von UVA, UVB und UVC variieren je nach Quelle leicht. Die Photonenenergie der Strahlung ist umgekehrt proportional zu ihrer Wellenlänge. Somit ist UVA-energieärmer als UVB-, welches wiederum energieärmer als UVC-Licht ist. Im Spektrum des Sonnenlichts ist UV-Licht aller Wellenlängen zu finden, auf die Erdoberfläche treffen jedoch nur UVA- und UVB-Strahlung, da UVC von der Ozonschicht gefiltert wird (Hockberger, 2002).

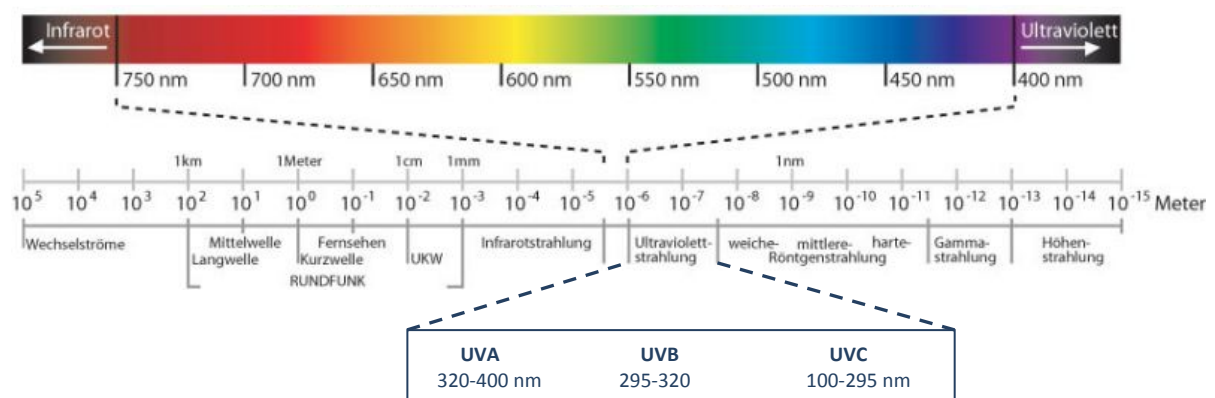


Abb. 6: Das elektromagnetische Spektrum

Ein Teil des elektromagnetischen Spektrums ist das für den Menschen sichtbare Lichtspektrum, das sich in einem Wellenlängenbereich von 750 nm bis 400 nm befindet. Bei Wellenlängen größer als 750 nm beginnt die Infrarotstrahlung, bei Wellenlängen kleiner als 400 nm die Ultraviolett-Strahlung. Diese kann je nach Wellenlänge in den UVA-Bereich (320-400 nm), UVB-Bereich (295-320 nm) und UVC-Bereich (100-295 nm) unterteilt werden (modifiziert nach: www.institut-heidger.de).

2.4.1 Wechselwirkungen von UV-Strahlung mit DNA und resultierende DNA-Schäden

Die von der Sonne ausgehende Strahlung besteht zu etwa 45 % aus UV-Licht. Durch die Ozonschicht der Atmosphäre wird Strahlung bis 310 nm vollständig absorbiert, wodurch UVC- und ein großer Teil der UVB-Strahlung die Erdoberfläche nicht erreichen (Van der Leun, 2004). Die auf der Erde ankommende UVA- und auch UVB-Strahlung hat Auswirkungen auf die Entstehung von Hautkrebs und Infektionskrankheiten, lässt sich aber auch zur Phototherapie nutzen (Norval, 2006). UVC-Strahlung erreicht durch die vollständige Absorption in der Ozonschicht zwar nicht die Bedeutung von UVA und UVB im täglichen Leben; da aber das Absorptionsmaximum der DNA mit 260 nm im Bereich der UVC-Strahlung liegt, ist sie zu einem wichtigen Instrument bei der Untersuchung zellulärer Antworten auf DNA-Schäden geworden (Battista *et al.*, 2009).

Komponenten der Zelle, welche vor allem im Wellenlängenbereich von UVC-Strahlung absorbieren, sind Nukleinsäuren und die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Cystein und Cystin (Clauß *et al.*, 2005). UVC-Strahlung verursacht somit genotoxische Effekte, die in erster Linie durch

zwei Mechanismen hervorgerufen werden: Einmal durch direkte Mechanismen durch Lichtanregung der DNA, wodurch Photoprodukte entstehen und zum anderen durch indirekte Mechanismen über die Anregung weiterer Moleküle, beispielsweise Porphyrine.

Energiereiche UVC- und UVB-Strahlung verursachen durch ihre hohe Energiedichte ähnliche direkte Schäden, wie z.B. die Zerstörung kovalenter Bindungen an biologischen Molekülen wie DNA und Proteinen. UVA-Strahlung dagegen ist nicht energiereich genug, um direkte Schäden an der DNA zu verursachen. Zelluläre Chromophoren wie NAD-Coenzyme, Riboflavin und Melanin absorbieren in diesem Wellenlängenbereich und agieren als endogene Photosensitizer. Hierbei werden chemische Radikale gebildet, die mit der DNA reagieren. Ebenso spielt die Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine Rolle, die zu oxidativen Schäden von zellulären Makromolekülen wie Lipiden, Proteinen und DNA führen (Brendler-Schwab *et al.*, 2004).

Die Bestrahlung von DNA bei 254 nm (UVC) verursacht in der Mehrzahl Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs). Mit einem Anteil von 71 % entstehen hierbei vor allem Thymidin-Dimere und in geringerem Maße (24 %) 6-4-Photoprodukte (6-4PPs) (Beukers und Berends, 1960, Douki und Cadet, 2001). Thymin-Glycole (3-4 %, Mitchell *et al.*, 1991), Cytosin-Hydrate, 8-oxo-Guanin, Einzelstrangbrüche und DNA-Protein-Crosslinks liegen in der Häufigkeit des Auftretens zwischen 0,1 und 2 % (Demple und Linn, 1982, Peak *et al.*, 1987, Doetsch *et al.*, 1995). Diese chemischen Produkte entstehen in sehr kurzer Zeit. Es wurde festgestellt, dass in einer Hautzelle jede Sekunde, die sie der Sonnenstrahlung ausgesetzt ist, 50-100 solcher Schäden induziert werden (Zhao *et al.*, 2010).

Die Bildung von CPDs erfolgt durch eine Dimerisierung zwischen zwei benachbarten Pyrimidinen. In den meisten Fällen sind zwei Thymidine an der Reaktion beteiligt, aber auch Cysteine können eine Rolle spielen. Durch Anregung mit UV-Licht wird in beiden beteiligten Molekülen die Doppelbindung zwischen dem C5- und C6-Atom der Pyrimidine unter gleichzeitiger Bildung von Einzelbindungen zwischen C5- und C6-Atom der beiden Moleküle aufgelöst, wodurch die Pyrimidine kovalent über einen Cyclobutanring verbunden sind (Abb. 7). 6-4PPs entstehen durch eine Bindung zwischen der 5' C4-Position und der 3' C6-Position der zwei benachbarten Pyrimidine (Li *et al.*, 2006). Die Folge dieser Reaktionen ist eine Veränderung der DNA-Struktur. Dies kann zum Erliegen von Transkription und Replikation führen. Trifft eine Replikationsgabel auf einen unreparierten ESB oder Basenschäden, entsteht ein DSB (Strumberg *et al.*, 2000). CPDs und 6-4PPs werden über die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) und Basen-Exzisions-Reparatur (BER) beseitigt (Brendler-Schwab *et al.*, 2004).

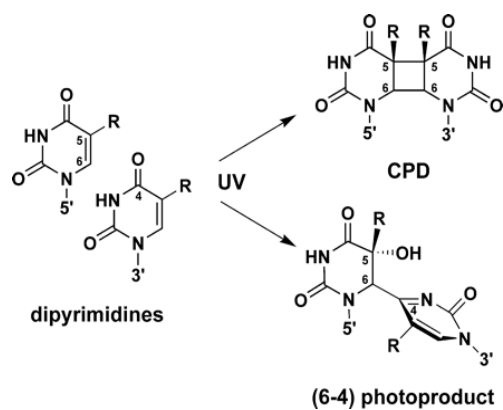


Abb. 7: Strukturformeln des Grundgerüsts von CPDs und 6-4PPs

Bei Bestrahlung von Zellen mit UV-Licht verändert sich häufig die Struktur der DNA, was auf Dimerisierungen innerhalb des DNA-Strangs zurückzuführen ist. Zwei auf einem DNA-Strang benachbarte Pyrimidine, meist sind es Thymidine, werden kovalent über einen Cyclobutanring verbunden. Hierbei handelt es sich um eine photoinduzierte Cycloaddition. Ein Thymidin-Molekül wird über ein Lichtquant angeregt, wodurch es zur Wechselwirkung mit dem benachbarten Thymidin kommt, welches sich noch im Grundzustand befindet. In beiden Molekülen wird dabei die Doppelbindung zwischen dem C5- und C6-Atom des Thymidins aufgehoben, gleichzeitig bilden sich zwischen den C5- und den C6-Atomen der beiden Moleküle Einzelbindungen aus.

Bei der Bildung von 6-4-Photoprodukten erfolgt eine Bindung zwischen der 5' C4-Position und der 3' C6-Position der zwei benachbarten Pyrimidine (Li *et al.*, 2006).

2.5 Erkennung und Reparatur von UV-induzierten DNA-Schäden

Bei Schädigungen der DNA durch UV-Licht werden vor allem zwei Reparaturwege aktiv, die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) und die Basen-Exzisions-Reparatur (BER). Die Hauptschäden bei UVC-Bestrahlung, 6-4PPs und CPDs, werden durch die NER repariert. 6-4PPs werden durch die BER wirkungsvoll beseitigt, die hingegen bei der Reparatur von CPDs weniger effizient ist (Mitchell *et al.*, 1985, Kim *et al.*, 1994). Einzelne Basenfehlpaarungen in neu replizierter DNA werden über die Mismatch-Reparatur (MMR) beseitigt. Diese entstehen trotz der proofreading-Aktivität der Polymerase δ , welche zu 99 % erfolgreich ist, während der Replikation der DNA in der S-Phase. Dennoch treten immer wieder fehlerhafte Basenpaarungen vor allem in repetitiven Sequenzen auf, an denen die Polymerase oft nur ein ineffizientes proofreading durchführt (Jascur und Boland, 2006). Die molekularen Mechanismen der MMR sind nah verwandt zur NER und BER.

2.5.1 Basen-Exzisions-Reparatur

Die BER ist der am häufigsten genutzte Reparaturweg in der Natur und der Hauptweg für die Entfernung und Reparatur modifizierter Basen oder abasischer (apurine oder apyrimidine) Stellen (AP-Stellen), sowohl in Bakterien als auch in Säugern (Barnes und Lindahl, 2004). Veränderte Basen werden durch eine DNA-Glycosylase erkannt und geschnitten, unterschiedliche Typen von Basenmodifikationen werden dabei durch spezielle Glycosylasen erkannt. So gibt es bislang 11 DNA-Glycosylasen in humanen Zellen, welche meist nur eine Klasse von DNA-Schäden erkennen (Friedberg *et al.*, 2006). Bei der Reparatur wird die n-glycosidische Bindung zwischen Base und Zucker-Rest des DNA-Strangs (Desoxyribose) aufgelöst und es entsteht eine AP-Stelle. Dieses Zwischenprodukt wird, ebenso wie spontan entstandene AP-Stellen, durch eine AP-Endonuclease prozessiert, um in weiteren Schritten die DNA-Synthese und die Ligation durchführen zu können (Hoeijmakers, 2001, Amouroux *et al.*, 2010).

Die BER wird in zwei Teilreparaturwege gegliedert. Beim „short-patch“ wird genau 1 Nukleotid ersetzt. Über diesen Reparaturweg laufen 80-90 % aller Reparaturprozesse ab, wohingegen der „long-patch“ nur einen Anteil von 10-20 % hat. Hier werden im Allgemeinen 2-10 Nukleotide ersetzt, wenn die AP-Stelle nicht für die direkte Neusynthese geeignet ist, sondern weitere Schäden aufweist. Die Beseitigung der AP-Stelle erfolgt bei der „short-patch“ Reparatur durch eine AP-Endonuklease, die 5´ von der AP-Stelle schneidet und unter Bildung einer freien 3´-OH-Gruppe ein abasisches Deoxyribose-Phosphat (dRP) bildet. Das dRP wird durch die Lyase-Aktivität der DNA-Polymerase β entfernt und die fehlenden Nukleotide im gleichen Schritt aufgefüllt. Der verbleibende ESB wird anschließend über LigaseIII/XRCC1 geschlossen (Matsumoto und Kim, 1995, Sinha und Häder, 2002, Robertson *et al.*, 2009). Zur Reparatur über „long-patch“ BER wird zusätzlich PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigene*) benötigt. Dieses Heterotrimer bildet einen Ring um die DNA mit dem Ziel, dem Polymerase-Komplex, bestehend aus den Polymerasen β , ϵ , ϕ und η , größere Stabilität zu verleihen. Am freigelegten 5´-OH Ende beginnt die Neusynthese des fehlenden DNA-Stücks, der alte DNA-Strang wird dabei verdrängt. Die FLAP-Endonuklease entfernt den alten DNA-Strang und es erfolgt die Ligation des ESBs (Wood *et al.*, 2001).

2.5.2 Nukleotid-Exzisions-Reparatur

Die NER wurde schon in den 1960er Jahren von Robert Painter in *Escherichia coli* nachgewiesen. Der Mechanismus ist bis zu Eukaryoten hochkonserviert und wurde Ende der 1980er Jahre in Säugerzellen größtenteils aufgeklärt (Venema *et al.*, 1990, Ljungman und Zhang, 1996). Über NER wird eine Vielzahl unterschiedlicher Läsionen repariert. Hierzu zählen sperrige DNA-Läsionen, Crosslinks innerhalb von DNA-Strängen, sowie CPDs und 6-4PPs. Das gemeinsame Charakteristikum der Substrate, die von der NER erkannt werden, ist eine lokale Verformung der DNA-Doppelhelix (Hess *et al.*, 1997).

Insgesamt sind mehr als 25 Genprodukte an der NER beteiligt (Aboussekhra *et al.*, 1995, Mu *et al.*, 1995), von denen viele durch die Charakterisierung der Krankheit *Xeroderma-Pigmentosum* (XP) identifiziert wurden. XP ist eine autosomal-rezessiv vererbte Krankheit, die sich bei Patienten in einer stark erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Sonnenlicht und einem erhöhten Hautkrebsrisiko äußert. Diesen Patienten ist es aufgrund eines Defektes in der NER nicht möglich, UV-Schäden in der DNA zu reparieren. Dieser Defekt beruht auf Mutationen in einem von sieben Genen, die mit XPA bis XPG bezeichnet werden (Hoeijmakers, 1994, Sancar, 1996).

Das entscheidende Ereignis bei der NER ist die beidseitige Entfernung eines Nukleotid-Schadens im DNA-Strang, wobei die ausgeschnittenen Fragmente zwischen 24 und 32 Nukleotide lang sein können. Danach erfolgt das Auffüllen der entstandenen Lücke in der DNA durch eine Polymerase und schließlich die Ligation des neu synthetisierten DNA-Abschnitts (Batty und Wood, 2000).

Die NER besitzt zwei untergeordnete Signalwege, die GG-NER (*Global Genome NER*) (Mullenders *et al.*, 1991, Feng *et al.*, 2003) und die TC-NER (*Transcription Coupled NER*) (Bohr *et al.*, 1985, Mellon *et al.*, 1987). Beide Wege unterscheiden sich nur in der Art der Erkennung des DNA-Schadens (Shuck *et al.*, 2008). Die GG-NER beseitigt Schäden in Bereichen des Genoms, die nicht transkribiert werden,

wohingegen die TC-NER die Reparatur von Schäden in Bereichen der DNA übernimmt, die aktiv transkribiert werden. Bis auf den unterschiedlichen Mechanismus in der Erkennung des Schadens sind beide Signalwege identisch (Abb. 8).

Kennzeichnend für die TC-NER ist die Erkennung von DNA-Schäden, welche den RNA-Polymerasell-Komplex blockieren (Fousteri und Mullenders, 2008). Bei der GG-NER werden die Schäden der DNA durch den Protein-Komplex XPC-Rad23B erkannt. Sind die DNA-Schäden durch UV-Bestrahlung induziert, spielt zusätzlich die Erkennung durch den UV-DDB (*UV-Damaged DNA-Binding Protein*)-Komplex eine Rolle (Sugasawa, 2009). Die Bindung dieser Proteine erleichtert die spätere Anlageung des Pre-Inzisions-Komplexes (Volker *et al.*, 2001, Moser *et al.*, 2005). Zunächst wird die DNA um die Schadensstelle geöffnet und entspannt, hierfür binden neben dem Faktor TFIIH (*Human basal transcriptional Initiation Factor*) RPA, XPA und XPG. Die ebenfalls zum TFIIH-Komplex gehörenden ATP-abhängigen Helikasen XPB und XPD entwinden die DNA (Drapkin *et al.*, 1994, Coin *et al.*, 2007). Zu beiden Seiten des DNA-Schadens wird die DNA nun von den Nukleasen XPG am 5'-Ende und ERCC1-XPF (*Excision Repair Cross Complementation group 1-XPF*) am 3'-Ende geschnitten (O'Donovan *et al.*, 1994), wobei die Schnitte asymmetrisch angesetzt werden. Am 3'-Ende ist der Schnitt 2-8 Nukleotide von der Läsion entfernt, am 5'-Ende 15-24 Nukleotide. Durch die beiden Schnitte wird ein einzelsträngiges Oligonukleotid-Fragment frei, wodurch eine Lücke in der DNA von 25-30 Nukleotiden entsteht. Wie auch im Falle der normalen DNA-Replikation wird nun PCNA mittels RFC auf die DNA geladen (Kelman, 1997). Die DNA-Polymerasen δ und ϵ synthetisieren DNA über die Lücke hinweg, der intakte Gegenstrang wird hierbei als Template verwendet (Gillet und Schärer, 2006). Die Stränge werden abschließend über die DNA-Ligase verbunden (Araujo *et al.*, 2000). Neuere Studien nehmen an, dass der XRCC1-LigaseIII-Komplex hauptsächlich am Ligationsschritt der NER beteiligt ist (Moser *et al.*, 2007).

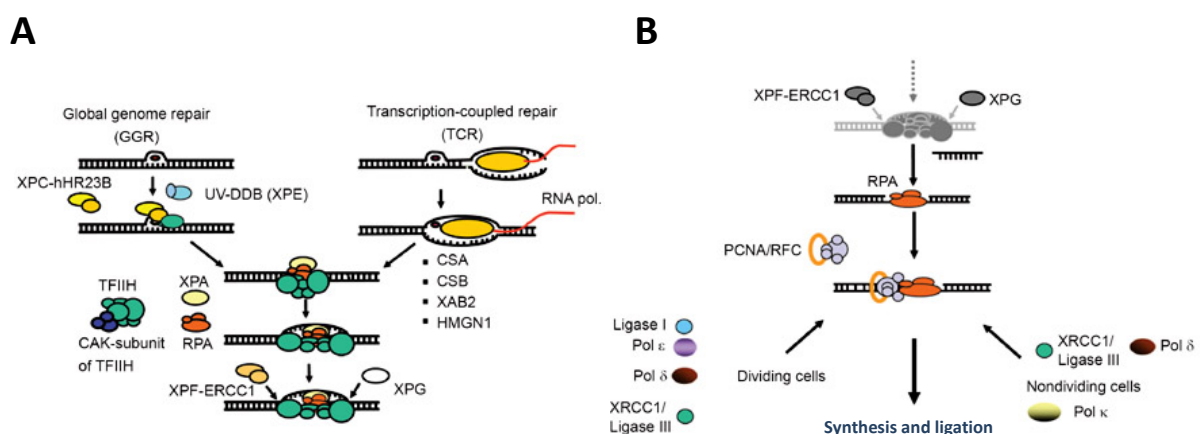


Abb. 8: Schematischer Ablauf der Nukleotid-Exzisions-Reparatur

(A) Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) besitzt zwei Signalwege, GGR (*Global Genome Repair*) und TCR (*Transcription Coupled Repair*). Die Erkennung des Schadens erfolgt bei der GG-NER über die Komplexe XPC-Rad23 (*Xeroderma Pigmentosum C*) und UV-DDB (*UV-Damaged DNA-Binding Protein*). Die Einleitung des TC-NER Wegs wird über die Blockierung der RNA-Polymerasell ausgelöst. Nach der Erkennung des Schadens treffen beide Signalwege zusammen. Durch die Bindung des TFIIH-Komplexes, XPA und RPA erfolgt die Öffnung der DNA um den Ort des Schadens. Rechts und links des beschädigten DNA-Strangs schneiden ERCC1-XPF und XPG.

(B) Nach Entfernung des geschädigten DNA-Abschnittes binden PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) und RFC (*Replication Factor C*). Der Einzelstrang wird über DNA-Polymerasen aufgefüllt und anschließend über eine DNA-Ligase zusammengefügt (Fousteri und Mullenders, 2008).

2.5.3 Mismatch-Reparatur

Die MMR ist an der Beseitigung von Fehlern in der DNA beteiligt, die während der Neusynthese der DNA entstanden sind. Daher führt der Verlust dieses Reparaturweges zu einer Ansammlung von Mutationen (100 bis 1000-fache Fehlerrate während der Replikation), wodurch in der Folge die Entstehung unterschiedlicher Krebsarten begünstigt wird (Jascur und Boland, 2006). MMR ist ein evolutionär von Bakterien bis hin zu Säugern hochkonservierter Prozess, wobei das bakterielle Reparatursystem biochemisch am besten untersucht ist (Modrich, 1991).

Die MMR kann in vier Phasen unterteilt werden. Zunächst erfolgt die Erkennung einer Fehlpaarung über hMSH α und hMSH β (human MutS Homolog; MutS wurde zuerst in Bakterien entdeckt). Das Heterodimer hMSH α besteht aus hMSH2 und hMSH6 und erkennt Basen/Basen-Fehlpaarungen und kurze Insertionen und Deletionen. hMSH β ist zusammengesetzt aus hMSH2 und hMSH3 und erkennt größere Insertionen und Deletionen (Peltomaki, 2003). Abgeleitet von der Kristallstruktur des MutS-Proteins aus Bakterien wird davon ausgegangen, dass diese Proteine in Gegenwart von ATP wie eine Klammer an der doppelsträngigen DNA in der Nähe des Schadens binden und sich seitlich an ihr entlang bewegen (Gradia *et al.*, 1997, Blackwell *et al.*, 1998). Im humanen System ist es für hMSH nicht möglich, neu synthetisierte DNA vom korrekten Elternstrang zu unterscheiden, aber in gegenwärtigen Modellen wird angenommen, dass sich im neu synthetisierten Strang „nicks“ als Erkennungsmerkmal befinden (Thomas *et al.*, 1991). In Bakterien hingegen ist die Erkennung des neu synthetisierten Strangs über die Methylierung der DNA möglich.

Im nächsten Schritt rekrutiert der Komplex aus DNA, hMSH und ATP den MutL-Komplex. Das Heterodimer MutL besteht aus hMLH1 und hPMS2 und entfernt die DNA-Polymerase und PCNA vom neu synthetisierten Strang. Anschließend werden die Exonuklease I (ExoI) und weitere Proteine der MMR rekrutiert, um die fehlerhaften Basen zu entfernen. Die Re-Synthese der DNA erfolgt über DNA-Polymerase δ , eventuell sind die DNA-Polymerasen α und ϵ ebenfalls daran beteiligt (Chang *et al.*, 2000).

2.6 Eukaryotischer Zellzyklus und Zellzykluskontrolle

Die Grundlage des Wachstums und der Vermehrung eukaryotischer Lebewesen ist der Zellzyklus. Er steuert und koordiniert die Reproduktion von Zellen. Bei proliferierenden Zellen wird das genetische Material verdoppelt, worauf die Teilung der Zelle erfolgt. Nicht korrekte Replikation und Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen kann zu genetischer Instabilität führen und unter anderem zur Entstehung von Krebs beitragen (Lengauer *et al.*, 1998). Bei Erkennung von Schäden an der DNA werden die Zellen an festgelegten Punkten im Zellzyklus, den Checkpoints (Hartwell und Weinert, 1989) angehalten, um ihnen Zeit zu geben, diese Schäden zu reparieren. Die Zellzykluskontrolle hat sich zu einem komplexen Mechanismus entwickelt, die die genomische Integrität gewährleistet.

2.6.1 Zellzyklus

Der Ablauf des Zellzyklus lässt sich in die vier zeitlich aufeinanderfolgende Phasen G1- (gap1), S- (Synthese), G2-Phase und Mitose gliedern (Sisken und Morasca, 1965). Die Länge der Phasen kann dabei je nach Zelltyp unterschiedlich sein. Die Periode zwischen den Mitosen (Zellteilungen) bezeichnet man als Interphase. Die G1-Phase entspricht dem Zeitraum zwischen mitotischer Teilung und dem Beginn der DNA-Synthese. Bezeichnend für die G1-Phase ist das Wachstum der Zelle durch die Vermehrung von Cytoplasma und die Neubildung von Organellen, sodass sie nach vorausgegangener Teilung wieder ihre ursprüngliche Größe erreicht. Die Zelle wird hier ebenfalls für die DNA-Replikation in der S-Phase vorbereitet, indem Enzyme und Desoxyribonukleosid-Triphosphate gebildet werden. Die G1-Phase ist eine wichtige regulatorische Phase, in der entschieden wird, ob die Zelle weiter den Zellzyklus durchläuft und sich teilt oder ob sie den Zellzyklus verlässt und in ein Ruhestadium (G0) eintritt. Findet eine Stimulation der Zelle mit mitogenen Signalen statt, tritt sie wieder zu dem Zeitpunkt in den Zellzyklus ein, wo sie ihn zuvor verlassen hat (Zetterberg *et al.*, 1995). Bei Eintritt in die S-Phase besteht jedes Chromosom zunächst aus einem Chromatid. Dieses wird während der etwa 8 h dauernden S-Phase verdoppelt, sodass jedes Chromosom aus zwei identischen Schwesterchromatiden besteht. Ist die Replikation abgeschlossen, tritt die Zelle in die G2-Phase ein. Dort findet ein weiteres Wachstum der Zelle statt und es werden Vorbereitungen, wie die Produktion spezifischer Proteine für die Mitose getroffen, in welcher sich die Zelle schließlich teilt (Blomen und Boonstra, 2007). Die Mitose kann in fünf ineinander übergehende Phasen aufgeteilt werden. Die Prophase ist gekennzeichnet durch ein Auseinanderweichen der Zentrosomen an die entgegengesetzten Zellpole. Sie sind der spätere Ausgangspunkt der Mitosespindel. Die Chromosomen sind am Ende dieser Phase vollständig kondensiert. In der folgenden Prometaphase formieren sich die Chromosomen in der Mitte der Zelle und an den Zentromeren setzen die Kinetochor- oder Chromosomenmikrotubuli an, welche die Chromosomen ausrichten. Die Kernhülle zerfällt und der Spindelapparat bildet sich aus. In der Metaphase werden die kondensierten Chromosomen in der Äquatorialebene ausgerichtet. Während der Anaphase werden die Chromatiden eines jeden Chromosoms durch die Spindelfasern zu den Zellpolen gezogen. Somit enthält jeder Zellpol einen vollständigen Chromatidensatz. Die Telophase ist die letzte Phase der Mitose, in der sich die Kernhülle wieder bildet und die Chromosomen decondensieren. Nach Kern- und Zellteilung sind zwei identische Tochterzellen entstanden.

Die „treibende Kraft“ für die Zellen im Voranschreiten des Zellzyklus sind Cycline, assoziiert mit Cyclin-abhängige Kinasen (Cdks), welche ihrerseits wiederum Proteine aktivieren, die ein Voranschreiten der Zelle im Zellzyklus bewirken (Abb. 9). Die Cdks sind Serin/Threonin-Kinasen, die ihren Namen wegen der zur Erlangung ihrer enzymatischen Aktivität erforderlichen Bindung eines Cyclins als regulatorische Untereinheit erhielten. Cdks sind in gleichbleibender Konzentration während des Zellzyklus vorhanden, Cycline werden zu bestimmten Zeiten des Zellzyklus verstärkt exprimiert und schnell wieder abgebaut. Die Konzentration der einzelnen Cycline bestimmt den Übertritt von einer Zellzyklus-Phase in die nächste.

Sobald die Zelle in die G1-Phase gelangt, wird CyclinD hochreguliert (Sherr, 1995). Dieses Protein bindet abhängig vom Zelltyp an Cdk4 oder Cdk6. Der aktive CyclinD/Cdk4/6-Komplex phosphoryliert das Retinoblastoma Tumorsuppressorprotein (pRb) (Blomen und Boonstra, 2007). pRb bindet mit den „Pocket-Proteinen“ p107 und p130 an Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie (Cobrinik, 1996, Dyson, 1998). Nach Phosphorylierung von pRb wird gebundenes E2F frei und bildet mit DP-Proteinen (*DRTF1-Differentiation Regulated Transcription Factor 1*) einen Transkriptionskomplex, der mit der DNA eine Bindung eingehen kann. Dies führt zur Transkription von Genen, welche für den Übergang von G1- nach S-Phase relevant sind (c-Myc, Cdc25A, CyclinA und CyclinE) (Helin, 1998, Mittnacht, 1998). Später in der G1-Phase wird der CyclinE/Cdk2-Komplex aktiviert, der den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase regelt (Koff *et al.*, 1992). In der frühen G1-Phase ist dieser Komplex durch Phosphorylierungen an Thr-14 und Thr-15 im Cdk2-Protein inaktiv. Die Dephosphorylierung dieser Threonine durch Cdc25A und gleichzeitige Phosphorylierung an Thr-160 durch die Cyclin-aktivierende Kinase (CAK) aktiviert den CyclinE/Cdk2-Komplex, der seine maximale Aktivität am G1/S-Übergang erreicht (Koff *et al.*, 1992). Dies führt zur Transkription von S-Phase-Genen und zur Initiation der DNA-Replikation (Jackman *et al.*, 2002). Bei Eintritt in die S-Phase wird CyclinA hochreguliert und bildet Komplexe mit Cdk2 (Girard *et al.*, 1991). Gegen Ende der S-Phase findet die Hochregulierung von CyclinB statt. In der G2-Phase bilden sich zusätzlich CyclinB/Cdk1- und CyclinA/Cdk1-Komplexe (Boonstra, 2003), welche für den Eintritt in die Mitose verantwortlich sind. Über post-translationale Modifikationen werden die Aktivitäten der Cyclin-Cdk-Komplexe negativ reguliert (van den Heuvel und Harlow, 1993), ebenso können Cdk-Inhibitoren die Cyclin-Cdk-Aktivität durch direkte Bindung an die Cdk-Untereinheit verhindern (Obaya und Sedivy, 2002).

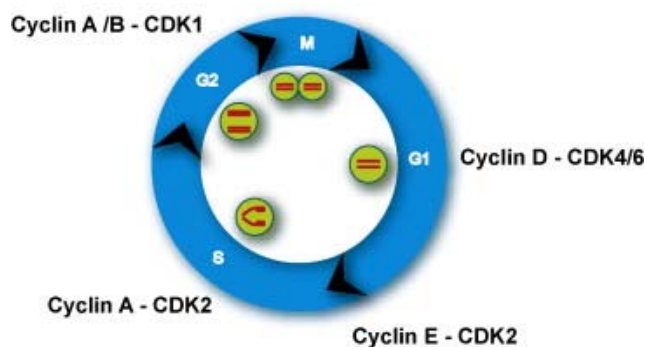


Abb. 9: Regulation des Zellzyklus über Cyclin-Cdk-Komplexe

Die Progression der Zellen durch den Zellzyklus wird über Hochregulation unterschiedlicher Cyclin-Cdk-Komplexe in den einzelnen Phasen des Zellzyklus reguliert. Während der G1-Phase ist der CyclinD-Cdk4/6-Komplex für die Progression der Zellen verantwortlich, gegen Ende dieser Phase wird der CyclinE-Cdk2 Komplex hochreguliert. Die Zellen progressieren weiter durch die S-Phase. Während der S-Phase und zu Beginn der G2-Phase findet die Hochregulation von CyclinA-Cdk2 statt. Kurz vor Mitose wird der Cyclin A/B-Cdk1-Komplex hochreguliert (Warmerdam und Kanaar, 2010).

Da in allen Phasen des Zellzyklus Schäden an der DNA auftreten können, ist es wichtig, diese vor ihrer Teilung zu beseitigen, um die Schäden nicht an Tochterzellen weiter zu geben.

Checkpoints sind Punkte im Zellzyklus einer eukaryotischen Zelle, an denen das Fortschreiten einer Zelle in die nächste Zellzyklusphase unterbunden werden kann, sofern die äußeren Bedingungen ungünstig sind. So führen z.B. manche DNA-Schäden zur Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden, welche Zellen am Eintritt in die S-Phase (G1/S-Checkpoint) oder in die Mitose (G2/M-Checkpoint) hindern.

2.6.2 G1/S-Checkpoint

Der Übergang von der G1- in die S-Phase kann durch Inhibierung der Replikation gestoppt werden. So soll verhindert werden, dass geschädigte DNA repliziert wird und DNA-Schäden in der S- und G2-Phase unrepariert verbleiben und so nach der Mitose an die Tochterzellen weitergegeben werden. Nachdem ein durch Röntgenstrahlung verursachter DSB über das Protein ATM detektiert wurde (Abraham, 2001, Bakkenist und Kastan, 2003), folgen zwei Signalwege, welche der Einleitung und Aufrechterhaltung des G1/S-Checkpoints dienen (Sancar *et al.*, 2004). ATM aktiviert und phosphoryliert die Moleküle p53 und Chk2 oder Chk 1 (Zhao *et al.*, 2002), wobei Chk2/Chk1 für die Initiation des G1/S-Arrests und p53 für seine Aufrechterhaltung verantwortlich ist. Phosphoryliertes Chk2/Chk1 wiederum phosphoryliert die Cdc25A-Phosphatase, wodurch diese inaktiviert und im Anschluss Ubiquitin-abhängig degradiert wird. Durch das Fehlen von Cdc25A akkumuliert die phosphorylierte, inaktive Form von Cdk2, welche so nicht in der Lage ist, Cdc45 zu phosphorylieren. Cdc45 kann in der Folge nicht auf die DNA geladen werden, wodurch die Replikation nicht eingeleitet werden kann (Abb. 10).

Dieser schnellen Antwort über Chk2/Chk1 und Cdc25A folgt die p53-vermittelte Aufrechterhaltung des G1/S-Checkpoints. ATM phosphoryliert p53 an Serin 15. Eine weitere Phosphorylierung erfolgt auch an Serin 20 durch Chk1 oder Chk2. Die Phosphorylierung von p53 verhindert den Export aus dem Zellkern und Abbau des Proteins, wodurch es im Zellkern akkumuliert. Eine weitere Stabilisierung von p53 wird durch Inhibierung seines Repressors Mdm2 erreicht (de Toledo *et al.*, 2000). Durch die Aktivierung von p53 wird die Expression von p21 hochreguliert, welches den Cdk2/CyclinE-Komplex durch Bindung inaktiviert und so den G1/S-Arrest aufrecht erhält. Außerdem bindet p21 an den Cdk4/CyclinD-Komplex und verhindert dadurch die Phosphorylierung des Rb-Proteins und die Ablösung des E2F-Transkriptionsfaktors. In der Folge werden keine S-Phase-Gene transkribiert und der G1/S-Checkpoint wird aufrecht erhalten.

Die Mechanismen zur Aktivierung des G1/S-Checkpoints nach UV-Strahlung sind ähnlich zu denen nach IR, die Detektion der Schäden erfolgt allerdings über ATR, welches Chk1 phosphoryliert. Aktiviertes Chk1 wiederum phosphoryliert Cdc25A, wodurch die Replikation ebenfalls nicht eingeleitet werden kann (Tibbetts *et al.*, 2000). In der Literatur gibt es widersprüchliche Aussagen dazu, ob UV-Bestrahlung in der Lage ist, einen G1/S-Checkpoint zu induzieren. Generell wird davon ausgegangen, dass nach UV-Bestrahlung einzelsträngige DNA auftritt, wodurch ATR aktiviert werden kann (Marini *et al.*, 2006). Unabhängig davon, allerdings abhängig von RPA, wird auch der Rad17-RFC (Rad17-*Replication Factor C*)-Komplex an die Schadensstelle gebracht. Während der normalen Replikation spielt dieser Komplex in leicht veränderter Form eine Rolle bei der Beladung der DNA mit PCNA (Zou *et al.*, 2003). Rad17-RFC erleichtert nachfolgend die Bindung der Rad9-Rad1-Hus1 „sliding clamp“ (9-1-1 sliding clamp) an die DNA, welche strukturelle Analogien zur PCNA-clamp zeigt (Dore *et al.*, 2009). Der 9-1-1 Komplex ist notwendig für die Chk1-Aktivierung durch ATR, gefolgt von einem Checkpoint-Signaling (Majka *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu Bestrahlung mit IR ist p53 bei der Bestrahlung mit UV nicht wesentlich für die Initiation des G1-Arrests (Loignon und Drobetsky, 2002). Immer noch unklar ist, welche Rolle der Reparaturweg des NER bei der Aktivie-

ung des Checkpoints spielt. ATR-abhängiges *Signaling* kann, inklusive der Phosphorylierung von H2AX, unabhängig von der Replikation nach NER von Photoprodukten durch UV-Bestrahlung auftreten (O'Driscoll *et al.*, 2003). Außerdem wurde gezeigt, dass die Aktivierung eines Checkpoints in der G1- und auch der G2-Phase nicht in NER-defizienten Zellen stattfinden kann (Giannattasio *et al.*, 2004). Es wird angenommen, dass die 24-30 Nukleotide umfassenden einzelsträngigen Bereiche, welche bei der NER auftreten und mit RPA interagieren, das Signal für die Checkpoint-Aktivierung darstellen (Jiang und Sancar, 2006).

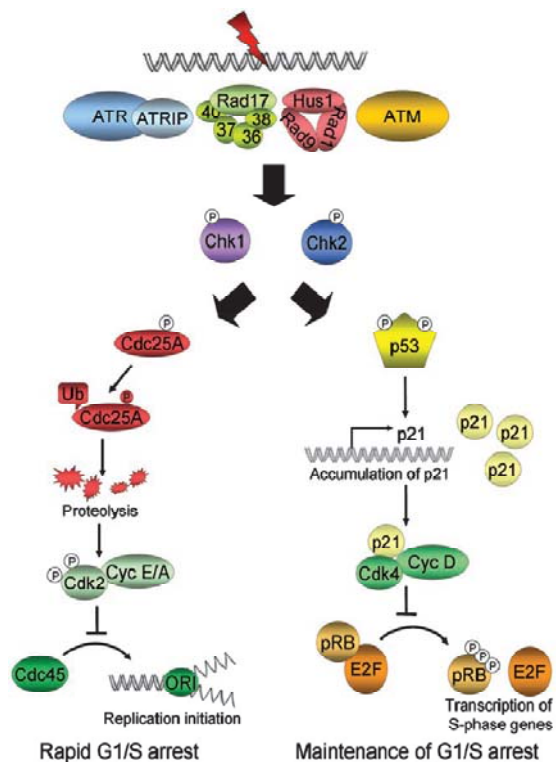


Abb. 10: Schematischer Ablauf zur Einleitung des G1/S-Checkpoints

Nach Auftreten von DNA-Schäden durch ionisierende Bestrahlung oder UV-Bestrahlung wird der Schaden über die Kinasen ATM und/oder ATR wahrgenommen. ATM und ATR phosphorylieren Rad17, Rad9, p53 und Chk1/Chk2. Chk1 und Chk2 wiederum phosphorylieren Cdc25A, wodurch dieses inaktiviert und degradiert wird. Dadurch akkumuliert die phosphorylierte, inaktive Form von Cdk2. Cdc45 kann in der Folge nicht mehr phosphoryliert werden, wodurch keine Replikation stattfindet. Dieser schnelle G1/S-Arrest wird über den p53-abhängigen Signalweg weiter aufrecht erhalten. Phosphoryliertes p53 bewirkt die Transkription von p21. p21 bindet an den CyclinD/Cdk4-Komplex, wodurch die Phosphorylierung des Proteins Rb verhindert wird. In der Folge werden keine E2F-Transkriptionsfaktoren bereitgestellt und die Transkription von S-Phase-Genen kann nicht stattfinden (Sancar *et al.*, 2004).

Das zentrale Ereignis während einer normalen Zellproliferation ist es, den „*Restriction Point*“ zu überwinden. Pardee, der den Begriff „*Restriction Point*“ prägte, zeigte, dass Zellen nur in den ersten beiden Dritteln ihrer G1-Phase eine Stimulation durch Wachstumsfaktoren benötigen und die G1-Phase danach auch in Abwesenheit von Mitogenen vollenden können (Pardee, 1974). Ist die Entscheidung, von der G1- in die S-Phase zu progressieren getroffen, läuft der Rest der Zellzyklus-Progression automatisch und vorhersehbar ab (Lundberg und Weinberg, 1999).

Demnach ist es für die Zelle ab einem bestimmten Zeitpunkt z.B. in der G1-Phase möglich, trotz eventuell vorhandener DNA-Schäden in die S-Phase einzutreten. Dieser Zeitpunkt liegt in der G1-Phase etwa 2 h vor Beginn der DNA-Synthese (Sancar *et al.*, 2004). Eine Interaktion zwischen pRb und Cyclin/Cdk führt zu einer Hyperphosphorylierung von pRb, wodurch die Zelle im Zellzyklus weiter voranschreitet. Nach diesem Punkt ist die Zelle nicht mehr länger unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren und tritt in die S-Phase ein, auch dann, wenn ihr Mitogene (z.B. Wachstumsfaktoren) entzogen werden (Zetterberg *et al.*, 1995).

2.6.3 Intra-S-Phase-Checkpoint

Während der S-Phase wird die Replikation der eukaryotischen DNA gleichzeitig an vielen Origins (Replikationsursprüngen) in verschiedenen Chromosomen gestartet. Dieser Prozess bedarf genauer Kontrolle und Regulation, auch in Gegenwart eventueller Schäden an der DNA, welche die Replikation behindern. Replikationsgabeln können an DNA-Schäden anhalten und kollabieren, was zu unreplizierten Regionen im Chromosom, Entstehung weiterer DNA-Schäden und letztlich genetischer Instabilität führen würde (Grallert und Boye, 2008). Um dies zu vermeiden, wird durch das Einsetzen von Intra-S-Phase-Checkpoints die Rate der Replikation gedrosselt, was zu einer Verzögerung der Progression durch die S-Phase führt (Bartek *et al.*, 2004, Lambert und Carr, 2005). Die Verzögerung wird dadurch erreicht, dass die Anlagerung einiger wichtiger Initiationsproteine an den Replikationsursprung verhindert wird (Costanzo *et al.*, 2000, Falck *et al.*, 2002). Ist die Replikation jedoch an einem Replikationsursprung gestartet, wird sie bis zum Ende durchgeführt (Painter und Young, 1980). Im Hefe-Modell wurde gezeigt, dass Intra-S-Checkpoints für die Bewahrung der genomischen Integrität wichtiger sind als G1- oder G2-Checkpoints (Myung *et al.*, 2001, Myung, Chen und Kolodner, 2001). Defekte an den Schlüsselkomponenten des Intra-S-Phase-Checkpoints schließen schwere neurodegenerative und immundefiziente Syndrome ebenso wie die Veranlagung zu bestimmten Krebsarten ein.

Man unterscheidet zwischen replikationsunabhängigem und -abhängigem Intra-S-Checkpoint. Werden DSBs in Genombereichen induziert, welche gerade nicht repliziert werden, erfolgt der Ablauf der Signalkaskade ähnlich der des G1/S-Checkpoints. Zur Detektion der DSBs oder andersartiger DNA-Schäden existieren zwei verschiedene Modelle, ein Weg führt über die Aktivierung von ATM (Bakkenist und Kastan, 2003), der andere über ATR (Zou und Elledge, 2003). Änderungen in der Chromatinstruktur z.B. durch DSBs erzeugen das initiale Signal für die Phosphorylierung von ATM-Dimeren, welche sofort zu Monomeren dissoziieren und ihre Zielproteine binden und phosphorylieren. Mediatoren dieses Weges sind neben MDC1 auch 53BP1 und BRCA1. Sie sind notwendig für die Amplifikation des Signals und erleichtern die Bindung an Substrate.

Zur direkten Bindung und Aktivierung von ATR an DSBs müssen zunächst einzelsträngige, mit RPA bedeckte DNA-Bereiche vorhanden sein. Über RPA wird anschließend das ATRIP-ATR-Heterodimer rekrutiert. Mediator in diesem Signalweg ist Claspin (Abb. 11).

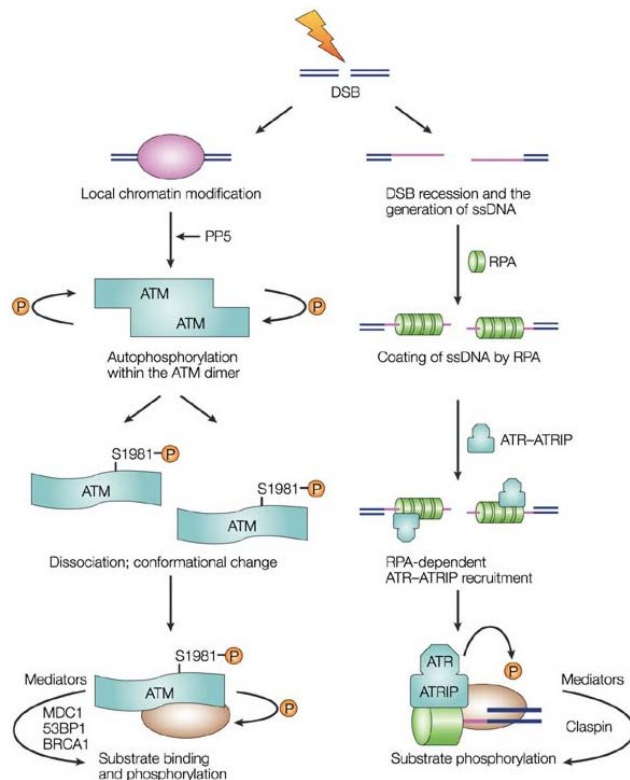


Abb. 11: Schematische Darstellung der Aktivierung von ATM und ATR nach DSBs in der S-Phase

In diesem Modell bedarf die Aktivierung von ATM keiner direkten Interaktion mit DSBs, sondern erfolgt durch Wahrnehmung von Veränderungen in der Chromatinstruktur. Nach Autophosphorylierung dissoziiert das inaktive ATM-Dimer in aktive Monomere, welche an Zielstrukturen binden und weitere Komponenten phosphorylieren.

Die Aktivierung von ATR erfolgt über die Resektion von DNA-Enden und der Entstehung von einzelsträngigen DNA-Bereichen, die mit RPA bedeckt werden. RPA dient zur Rekrutierung des ATR-ATRIP-Komplexes an den DSB. Die dargestellten Mediatoren Claspin und auch MDC1, 53BP1 und BRCA1 in Signalweg A modulieren die Aktivität der ATM- und ATR-Kinase und erleichtern die Substratbindung (Bartek *et al.*, 2004).

Die weitere Regulation des Checkpoints verläuft über mehrere parallele Wege. Ein Zweig des über DSBs induzierten Intra-S-Phase-Checkpoints ist der Signalweg über ATM-MDC1-MRN-SMC1 (*Structural Maintenance of Chromosomes 1*), von welchem die Verlangsamung der Replikationsrate bestrahlter Zellen abhängt. Ein paralleler Signalweg läuft über Chk1/Chk2 und die Proteolyse der Cdc25A-Phosphatase. Nach Aktivierung von ATM über DSBs wird mittels Chk1 und Chk2 die Rate der Phosphorylierungen erhöht. Chk1 phosphoryliert dabei das relativ instabile Protein Cdc25A schon in der unbestrahlten S-Phase, vermittelt über ATR. Die schadensspezifische Aktivierung der Chk2-Kinase über ATM verstärkt diesen Effekt (Sorensen *et al.*, 2003). Dies führt zu einer stärkeren Interaktion mit der SFC β -TrCP Ubiquitin-Ligase und dem beschleunigten Abbau des Proteins Cdc25A. Es folgt die Inaktivierung von Cdk2/CyclinE/A, was zur Verhinderung der Initiation der Replikation an den Origins führt. Defekte in Proteinen der Intra-S-Phase-Checkpoint-Antwort nach IR zeigt sich darin, dass defekte Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen die Rate der DNA-Replikation nicht reduzieren können, was als *Radioresistant DNA Synthesis* (RDS) bekannt ist. Diese Beobachtung wurde zuerst an Zellen gemacht, welche von *Ataxia Telangiectasia* (AT)-Patienten stammten und Mutationen im Gen aufwiesen, welches für ATM kodiert (Shiloh, 2001, Shiloh und Kastan, 2001). RDS wurde seither in Zellen mit Defekten auch in anderen Komponenten und Proteinen des Intra-S-Phase-Checkpoints festgestellt.

Nicht nur IR-, sondern auch UV-Bestrahlung ist in der Lage, Replikationsgabeln zu blockieren und den Intra-S-Phase-Checkpoint zu aktivieren. Dabei genügen schon geringe Fluenzen von 1 J/m^2 , welche die Initiationsrate der Replikons um die Hälfte reduzieren (Kaufmann und Cleaver, 1981). Diese Fluenzen wirken jedoch nicht zytotoxisch (Bassett *et al.*, 2004). Die bei UVB- und UVC-

Bestrahlung entstehenden mutagenen Photoprodukte CPDs und 6-4PPs (siehe 2.4) blockieren die DNA-Replikation durch die replikativen DNA-Polymerasen α und δ (Ünsal-Kaçmaz *et al.*, 2007). Die Intra-S-Phase-Checkpoint-Antwort auf Bestrahlung mit UV unterscheidet sich von der Antwort auf IR. ATM und der MRN-Komplex werden nicht benötigt (Heffernan *et al.*, 2002), Cdc25A wird nicht degradiert und Cdk2/CyclinE/A somit nicht inhibiert. Stattdessen vermittelt durch RPA aktiviertes ATR über Claspin, den Tim/Tipin-Komplex (*Timeless/Tim-interacting-Protein*) (Ünsal-Kaçmaz *et al.*, 2005) und Chk1 die Inhibierung der Initiation der Replikation. Die Intra-S-Phase-Checkpoint-Antwort reduziert daraufhin die Anzahl der aktiven Replikons, um die Wahrscheinlichkeit zu verringern, dass die Replikationsgabeln auf UV-induzierte CPDs und 6-4PPs treffen, bevor diese repariert sind. Außerdem scheint auch die Verlängerung des DNA-Strangs in aktiven Replikons verlangsamt zu werden.

Der replikationsabhängige Checkpoint wird aktiviert, sobald Replikationsgabeln blockiert werden. Schlüsselkomponenten dieses Signalwegs sind neben RPA und ATR-ATRIP das Mediatorprotein Claspin und Rad17, sowie der 9-1-1-Komplex. Dieser Checkpoint besitzt zwei Funktionen. Zum einen verhindert er die Initiation der DNA-Replikation an Origins, zum anderen schützt er die Integrität der Replikationsgabeln (Lukas *et al.*, 2004).

2.6.4 G2/M-Checkpoint

Die Aufgabe des G2/M-Checkpoints ist es zu verhindern, dass sich Zellen mit DNA-Schäden teilen. Er gibt die Möglichkeit, diese Schäden vor der Zellteilung zu reparieren, um sie nicht an Tochterzellen weiterzugeben und so Mutationen im Erbgut zu begünstigen. Der G2/M-Checkpoint wird über den CyclinB/Cdk1-Komplex und dessen negative Regulatoren p21^{cip1} und p27 kontrolliert (Dash und El-Deiry, 2005). Chk1 und Chk2 geben auch bei diesem Checkpoint Signale von DNA-Schäden weiter, welche über ATM bei IR (Pandita *et al.*, 2000) detektiert wurden. Die nachfolgende Signalkaskade kann analog zum G1/S-Checkpoint abhängig und unabhängig von p53 ablaufen. Im p53-abhängigen Signalweg wird p53 phosphoryliert und aktiviert daraufhin Zielgene wie p21 und 14-3-3. Die Proteine inhibieren den CyclinB/Cdk1-Komplex, wodurch ein Fortschreiten in die Mitose verhindert wird (Hermeking *et al.*, 1997, Dulic *et al.*, 1998). Der p53-unabhängige Signalweg läuft über die Phosphorylierung von Cdc25 durch Chk1 und Chk2, wodurch die Aktivität von Cdc25 sinkt und das Protein aus dem Kern transportiert wird (Loffler *et al.*, 2007). Chk1/2 phosphoryliert außerdem Wee1, wodurch dessen Aktivität erhöht wird. Die Phosphorylierung von Cdc25 und Wee1 reduziert die Aktivität von CyclinB/Cdk1, was zu einem G2/M-Arrest führt (Porter und Donoghue, 2003).

Es gibt Hinweise, dass der G2/M-Checkpoint auch ATR-abhängig nach UV-Bestrahlung aktiviert werden kann (Wright *et al.*, 1998, Stiff *et al.*, 2006).

2.7 Mikroskopie

2.7.1 DSB-Reparaturmessung mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Bereits vor über 70 Jahren wurde die Methode der Immunfluoreszenz-Mikroskopie angewendet. So gelang z.B. dem Mikrobiologen Albert Coons die Darstellung von Bakterien mittels spezifischer Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper (Coons und Kaplan, 1950). Bei Immunfluoreszenz-Mikroskopie werden Antikörper-gekoppelte Fluorochrome über eine bestimmte Wellenlänge des Lichtspektrums angeregt und das Licht sofort absorbiert. Über die Absorption des Anregungslichts gelangen Elektronen auf ein höheres Energieniveau. Dieser Zustand ist nicht stabil, sodass die Elektronen wieder auf ihr Grundniveau zurückfallen und Licht einer größeren Wellenlänge emittiert wird. Die Färbung von Proteinen und speziellen Strukturen über Fluorochrom-gekoppelte Antikörper eröffnet viele Möglichkeiten zur Untersuchung von Vorgängen in der Zelle z.B. bei der Reparatur von DSBs. Nach Auftreten von DSBs nach IR akkumulieren in festgelegter zeitlicher Abfolge viele Proteine am Schadensort bzw. es werden Proteine am Schadensort nach Auftreten eines Bruches phosphoryliert. Als etablierte Marker zur Detektion von DSBs gelten das schon erwähnte γ -H2AX (West und Bonner, 1980, Rogakou *et al.*, 1999, Mahrhofer *et al.*, 2006) und 53BP1, welches mit γ -H2AX kolokalisiert (Schultz *et al.*, 2000, Rappold *et al.*, 2001). Das Histon H2AX wird bereits wenige Minuten nach Auftreten eines DSBs in einem Bereich von mehreren Megabasenpaaren um den Bruch phosphoryliert (γ -H2AX), weswegen diese Phosphorylierung anschließend als deutlich sichtbarer Focus nach Färbung mit Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen wird. Das Protein 53BP1 liegt in unbehandelten Zellen diffus im Zellkern verteilt vor. Nach Auftreten von DSBs nach IR akkumulieren 53BP1-Proteine in großer Zahl am Ort eines DSBs und es zeigen sich innerhalb von 5 min bis 15 min diskrete Foci (Schultz *et al.*, 2000). Die Anzahl der Foci ist hierbei proportional zur Dosis (Löbrich *et al.*, 1993, Ruiz de Almodovar, 1994). 53BP1-Foci kolokalisieren mit γ -H2AX-Foci ebenso wie mit Mre11-, Nbs1-, Rad50- und ATM-Foci (Rogakou *et al.*, 1998, Paull *et al.*, 2000, Bekker-Jensen *et al.*, 2006).

Davon ausgehend, dass ein Focus einen DSB anzeigt (Rothkamm und Löbrich, 2003), ist es möglich, die DSBs einer Zelle über mikroskopische Auswertung genau zu quantifizieren. Ebenso kann die Reparatur der DSBs durch Abnahme der Foci über die Zeit nachgewiesen werden. Andere Methoden zur Quantifizierung von DSBs, wie z.B. Pulsfeld-Gelelektrophorese oder Comet-Assay, benötigen mindestens 40-100 Brüche pro Zelle, um zuverlässige Aussagen zu treffen. Diese Methoden sind daher im Vergleich zur Detektion von DSBs über die Immunfluoreszenz-Mikroskopie auf Einzelzellenebene (Olive *et al.*, 1991) insensitiver. Zudem ermöglicht die Doppelfärbung der Zellen mit Zellzyklus-Markern die Untersuchung von Zellen in unterschiedlichen Zellzyklus-Phasen ohne vorherige Synchronisierung.

Abhängig von Zellzyklus-Phase und Zellsystem können die Ausprägungen der Foci bzw. das Hintergrundlevel unterschiedlich ausfallen. So beeinflusst beispielsweise auch die Chromatinkonformation die Größe der Foci (Reitsema *et al.*, 2004).

Ein Nachteil der Immunfluoreszenz-Mikroskopie liegt darin, dass nur mit toten Zellen gearbeitet werden kann, die zu einem bestimmten Zeitpunkt fixiert wurden. Dadurch lassen sich dynamische Prozesse eines Proteins innerhalb des Zellkerns nur schlecht verfolgen. Eine Weiterentwicklung, mit der diese Probleme umgangen werden können, stellt die Methode des *Live Cell Imaging* (LCI) dar.

2.7.2 *Live Cell Imaging*

Seit vor über 50 Jahren von David Rogers die Jagd einer neutrophilen Zelle auf ein Bakterium auf 16 mm Film aufgenommen wurde, hat sich das LCI beständig weiter entwickelt. Neue Techniken, Unterstützung der Prozesse durch Computer und hochentwickelte, stabile fluoreszierende Proteine erlauben es, komplexe biologische Vorgänge detailliert zu untersuchen.

Beim LCI werden mit Hilfe inverser Mikroskope dynamische Prozesse in lebenden Zellen über einen Beobachtungszeitraum, der wenige Minuten bis mehrere Tage betragen kann, verfolgt. Dabei kann das Verhalten einer einzelnen Zelle in Intervallen von wenigen Sekunden bis Stunden über eine Kamera dokumentiert werden. Die Digitalkamera wird über eine Computersoftware gesteuert und durch Aneinanderreihung der aufgenommenen Bilder ergibt sich ein Zeitrafferfilm. Dieser ermöglicht es z.B. die Bewegungen und das Verhalten der Zelle während ihres Zellzyklus sichtbar zu machen. Die Säugerzellen benötigen streng definierte Umgebungsbedingungen, um optimal wachsen zu können und keine Stress-Antwort zu induzieren (Frigault *et al.*, 2009). Dies gelingt durch die Versorgung mit einem optimiertem Medium, einem Inkubator, in dem die Luftfeuchtigkeit reguliert wird, die Zellen mit 5 % CO₂ begast werden und eine einheitliche Temperatur von 37°C herrscht. Der entscheidende Vorteil dieser Methode im Vergleich zur konventionellen Immunfluoreszenz-Mikroskopie besteht in der Möglichkeit, dass Zellen nicht fixiert werden müssen, sondern das Verhalten von Proteinen in lebenden Zellen permanent und in kurzen Zeitabständen „live“ verfolgt werden kann.

Ein bedeutender Einschnitt in der Verwendung von LCI-Systemen war die Entdeckung und Entwicklung fluoreszierender Proteine, die als molekulare Marker dienten. Als erstes wurde GFP (*Green Fluorescent Protein*) entdeckt (Shimomura *et al.*, 1962), ein verwandtes Protein zu Aequorin, dem chemilumineszenten Protein der Qualle *Aequoria victoria*. Die Besonderheit dieses Proteins war, dass es nach Anregung mit einer Wellenlänge des Lichts zwischen 400-500 nm selbst fluoreszierte und weder Substrate noch Coenzyme benötigte. Osamu Shimomura erhielt zusammen mit Martin Chalfie und Roger Tsien 2008 den Nobelpreis für Chemie für die Entdeckung und Weiterentwicklung des grün fluoreszierenden Proteins. Bei Verwendung von Fusions-Konstrukten bestimmter Gene mit fluoreszierenden Proteinen (Prasher *et al.*, 1992) dürfen die Eigenschaften des Ursprungsproteins durch den angehängten Fluoreszenz-tag nicht verändert werden, was bei GFP erfüllt wurde. Im Laufe der Zeit wurden die Eigenschaften des GFP durch gezielte Mutationen immer weiter verbessert, sodass die Geschwindigkeit der Fluorophor-Bildung, die korrekte Faltung und Stabilität bei 37°C, sowie die Helligkeit verbessert werden konnten. Dadurch war es möglich, lebende Zellen auch mit geringen, weniger belastenden Lichtintensitäten über einen längeren Zeitraum zu beobachten und gleichzeitig das Fluorophor nur geringfügig auszubleichen. Die Weiterentwicklung von GFP brachte

zusätzlich andere Farbvarianten wie YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) oder CFP (*Cyan Fluorescent Protein*) hervor, wodurch die gleichzeitige Untersuchung mehrerer Proteine in der lebenden Zelle möglich wurde (Lippincott-Schwartz und Patterson, 2003). Eine rote Farbvariante, das DsRed, wird aus *Anthozoa discosoma*, einer Scheibenkoralle gewonnen.

Mit diesen fluoreszierenden Markern fusionierte Proteine konnten in lebenden Zellen sichtbar gemacht, lokalisiert und innerhalb der Zelle zu verfolgt werden. Durch diese Methode war es möglich, auch Proteine der DSB-Reparatur an Fluoreszenz-Farbstoffe zu koppeln und die nach Bestrahlung resultierenden Foci zu detektieren. Ebenso kann die Mobilität von Proteinen und Diffusionsgeschwindigkeit von Molekülen über FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) und FLIP (*Fluorescence Loss In Photobleaching*) in lebenden Zellen gemessen werden. Hierbei wird ein definierter Bereich einer fluoreszierenden Probe ausgebleicht und gemessen, mit welcher Geschwindigkeit ungebleichte Fluorochrome aus der Umgebung in den gebleichten Bereich wandern. Letztendlich kann die Antwort jeder einzelnen Zelle untersucht werden (Zetterberg *et al.*, 1995).

Die Methode des LCI bietet neue Möglichkeiten in Bezug auf die zeitliche Auflösung von Experimenten und die Untersuchung von Vorgängen in einzelnen Zellen. Dabei muss allerdings immer der Kompromiss zwischen guter Bildqualität und optimalen Umgebungsbedingungen gefunden werden. So sind Zellen in ihrer natürlichen Umgebung selten Licht ausgesetzt. Die Anregung der fluoreszierenden Proteine bei der Aufnahme mit UV-Licht kann die DNA schädigen, Infrarot-Licht kann Medium und Zellen zusätzlich erwärmen oder es können sich freie Radikale bilden (Pattison und Davies, 2006). Dies kann unerwünschte Reaktionen der Zellen hervorrufen. Die beste Möglichkeit, dem entgegenzuwirken ist die Reduzierung des Anregungslichts auf ein Minimum und die Optimierung der Detektion über die Kamera und das optische System des Mikroskops.

2.7.2.1 PCNA und DNA-Ligasel als Marker zur Identifikation des G1/S-Übergangs

Zur Untersuchung des G1/S-Checkpoints muss es möglich sein, den Übergang von der G1- in die S-Phase genau zu bestimmen, was vor allem für die Beobachtung der Zellen in *Live Cell Imaging*-Anwendungen von Bedeutung ist. Beim G1/S-Übergang gibt es keinen markanten Erkennungspunkt im Zellzyklus, wie es beim G2/M-Übergang der Fall ist. Hier beendet die Mitose die G2-Phase, ein Vorgang, der auch im Durchlichtmodus bei *Live Cell Imaging*-Aufnahmen gut zu verfolgen ist. Neben klassischen S-Phase-Markern wie BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin) wurden zusätzlich die Marker PCNA in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie und DNA-Ligasel gekoppelt an das Fluorochrom RFP (*Red Fluorescent Protein*) in LCI-Experimenten zur Erkennung der S-Phase in der vorliegenden Arbeit verwendet.

2.7.2.2 PCNA

Zur Reproduktion und Weitergabe genetischer Informationen muss eine Zelle ihr Genom verdoppeln, bevor es schließlich bei der Mitose auf die Tochterzellen aufgeteilt wird.

Ein Enzym, das vor allem bei der Replikation involviert ist, ist das *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA). Es rekrutiert entscheidende Faktoren wie replikative Polymerasen für diesen Vorgang an

die Replikationsgabel. PCNA wurde bei Patienten mit der Autoimmun-Erkrankung *Lupus erythematosus* als ein Autoantigen entdeckt (Jonsson und Hübscher, 1997). Zusätzlich dient PCNA als Proliferations-Marker für die Prognose bei Tumorentwicklungen (Jain, 1991).

PCNA ist ein ringförmiges Protein, das zur Familie der DNA sliding β -clamps zählt und evolutionär von der Hefe bis zum Menschen hoch konserviert ist (Bravo, 1987, Kelman, 1995, Wyman und Botchan, 1995). Es ist symmetrisch und aus drei identischen Monomeren aufgebaut (Krishna, 1994, Maga und Hübscher, 2003, Ivanov, 2006). Die innere Schicht dieses ringförmigen Proteins besteht aus positiv geladenen α -Helices, welche den Kontakt zum Phosphat-Rückgrat der DNA herstellen, die Außenseite setzt sich aus β -Faltblättern zusammen. Die Funktion von PCNA besteht darin, interagierenden Partnern wie DNA-Replikationsproteinen, Proteinen, die in der Zellzyklus-Kontrolle eine Rolle spielen und Proteinen, die der Chromatinregulation und Transkription dienen, eine stationäre „loading platform“ zu bieten und sie so in der Nähe der DNA zu halten (Prosperi, 2006). Außerdem rekrutiert PCNA Elongationsfaktoren wie DNA-Ligasel (Görisch, 2008), DNA-Polymerasen und DNA-Reparatur-Proteine (Maga und Hübscher, 2003). Eine der Hauptstellen für die Wechselwirkung mit Proteinen ist die Domänen-verbindende Schleife an der Seite von PCNA, die sich von den Resten L121 bis E132 zieht. Sie wird unter anderem von Polymerase δ , p21, FLAP-Endonuklease 1 (Fen1) und DNA-Ligasel (LigI) erkannt.

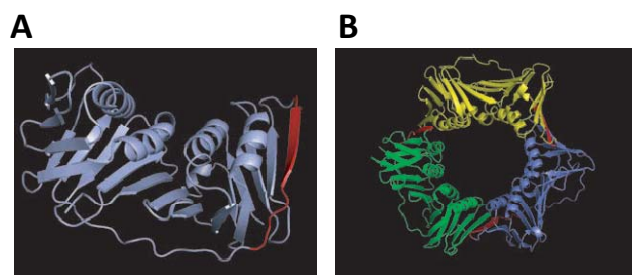


Abb. 12: Dreidimensionale Struktur von PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)

(A) Monomer des Proteins PCNA. (B) Zusammengefügte Monomere zu einem symmetrischen trimeren Ring. Die Außenseite des Proteins besteht aus β -Faltblättern, die Innenseite mit Kontakt zur DNA setzt sich aus positiv geladenen α -Helices zusammen. PCNA dient als „loading platform“, Proteine der Zellzyklus-Kontrolle und der DNA-Reparatur werden so nach einem DNA-Schaden in der Nähe der DNA gehalten (Rottach *et al.*, 2008).

PCNA ist somit eine zentrale Komponente der Replikationsmaschinerie in der Zelle. Dort, wo Replikation im Zellkern stattfindet, kann man Komplexe aus DNA und Replikationsproteinen als „Replikations-Foci“ mikroskopisch sichtbar machen (Hozak *et al.*, 1993). Sie sind fest im Zellkern verankert und sehr heterogen in Größe und Lebensdauer. Das typische Muster in der S-Phase, ähnlich dem Ligasel-Muster (siehe Kapitel 2.7.2.3), entsteht durch allmähliche asynchrone Aggregation und Abbau des Proteins während dieser Phase (Leonhardt *et al.*, 2000).

Wie zuvor erwähnt, findet sich eine Funktion für PCNA auch bei der DNA-Reparatur. Bei der Nukleotid-Exzisions-Reparatur bindet PCNA die Endonuklease XPG, welche am 3'-Ende eines DNA-Schadens schneidet (Gary *et al.*, 1997). Außerdem wird für diesen Reparaturweg die Polymerase δ zur Strangsynthese benötigt, welche durch PCNA an die DNA gebracht wird.

Die Frage, welchen Bereich der S-Phase PCNA abdeckt, untersuchten Coltrera und Gown (1991). Hierzu wurde die Markierung der Zellen mit PCNA mit der von BrdU, einem Standard-Marker für die S-Phase im Zellzyklus, in unterschiedlichen Zelllinien verglichen. In schnell proliferierenden Zellen, wie beispielsweise HeLa-Zellen, überlappten die Signale von PCNA und BrdU vollständig. In langsam proliferierenden Zelllinien, wie HUVE-Zellen zeigte sich eine unvollständige Überlappung beider Populationen. Die Nomenklatur für die Einteilung der Zellen in PCNA-positiv und -negativ wurde von Celis und Celis (1985) vorgenommen.

Bei UV-Bestrahlung von Zellen wurde ein PCNA-Signal auch in Zellen, welche sich außerhalb der S-Phase befanden, gemessen. Dieses war in G1- und G2-Phase-Zellen mit steigenden UV-Dosen (16 J/m^2 bis 30 J/m^2) immer deutlicher zu beobachten. Der Grund ist die einsetzende NER, auch in G1- und G2-Zellen (Celis und Madsen, 1986). Aus diesem Grund scheidet PCNA als S-Phase-Marker nach UV-Bestrahlung von Zellen aus.

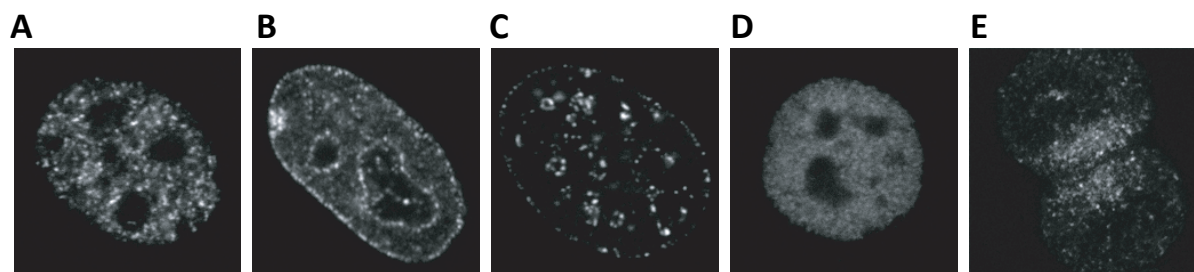


Abb. 13: Zellzyklus-abhängige Verteilung von PCNA

In der frühen S-Phase (A) ist PCNA über den ganzen Zellkern verteilt und zeigt die initialen Replikations-Foci an. In der mittleren S-Phase (B) wird das Euchromatin repliziert, dementsprechend wandern die PCNA-Foci vor allem an die Peripherie und rund um die Nucleoli des Zellkerns. Wird in der späten S-Phase (C) Heterochromatin repliziert, werden die Foci größer und beginnen langsam zu verschwinden. Außerhalb der S-Phase (D) sowie während der Mitose (E) sind keine PCNA-Foci nachweisbar (Rottach *et al.*, 2008).

2.7.2.3 DNA-Ligasel

Ein entscheidender Schritt der DNA-Replikation, -Reparatur und -Rekombination ist die Ligation von DNA durch DNA-Ligasen. Säugerzellen besitzen drei dieser Enzyme, DNA-Ligasel, III und IV, welche ATP-abhängig die Verbindung von Brüchen im Phosphodiester-Rückgrat der DNA katalysieren. Obgleich die katalytische Domäne aller drei Enzyme hochkonserviert ist und sie sich denselben grundlegenden Reaktionsmechanismus zunutze machen, sind ihre jeweiligen Funktionen unterschiedlich (Mortusewicz, 2006).

Durch Kristallstrukturanalysen (Pascal *et al.*, 2004) konnte gezeigt werden, dass DNA-Ligasel die DNA-Doppelhelix „ordnet“, um die gebrochenen Enden für die strangverbindende Reaktion gut zugänglich zu machen. Außerdem wurde eine DNA-bindende Domäne entdeckt, die es der DNA-Ligasel erlaubt, ihr DNA-Substrat zu umgeben, die DNA in einer verdrehten Stellung zu stabilisieren und so das katalytische Zentrum an der Bruchstelle zu positionieren. DNA-Ligasel ist hauptsächlich während der S-Phase des Zellzyklus aktiv und wird für die Verbindung von Okazaki-Fragmenten bei der semikonservativen Replikation der DNA benötigt (Mackenney *et al.*, 1997). Zudem spielt die DNA-Ligasel eine wichtige Rolle bei der BER, bei der NER und der Reparatur von DSBs über HR

(Goetz *et al.*, 2005). Die End-Joining-Aktivität von DNA-Ligasel ist durch die Interaktion mit PCNA über eine N-terminale PCNA-bindende Domäne gegen DNA-Replikations-Stellen gerichtet (Montecucco *et al.*, 1995, Cardoso *et al.*, 1997). Wird das Enzym an ein Fluorochrom, hier RFP (*Red Fluorescent Protein*), gekoppelt, kann es beim *Live Cell Imaging* Verwendung finden. Über Anregung mit Auflicht ist die Emmission von RFP auch in lebenden Zellen zu verfolgen.

Das typische Ligasel-Muster entsteht während der DNA-Replikation in der S-Phase, wenn Ligasel-Enzyme, die zunächst diffus im Zellkern verteilt vorliegen, sich vermehrt an den Replikationsgabeln bzw. den Okazaki-Fragmenten anlagern. Zudem ist es möglich, die S-Phase durch Veränderung des Ligasel-Musters in deren Verlauf, in eine frühe, mittlere und späte Phase einzuteilen. Der Grund hierfür liegt in der Chromatinstruktur der DNA begründet. In Versuchen mit künstlich synthetisierten Chromosomen von Brenda Grimes (Grimes *et al.*, 2004) wurde festgestellt, dass Heterochromatin-arme Chromosomen in der frühen S-Phase repliziert wurden, Heterochromatin-reiche hingegen erst in der mittleren bis späten S-Phase. So beginnt die Replikation zunächst am weniger dicht kondensierten Euchromatin, welches hauptsächlich im Inneren des Zellkerns vorliegt. Die DNA-Ligasel-Foci sind hierbei noch über den gesamten Zellkern verteilt, woran die frühe S-Phase zu erkennen ist. Anschließend wird das stark kondensierte Heterochromatin am Rande des Zellkerns repliziert, wodurch die DNA-Ligasel-Foci nun vor allem am Rand des Zellkerns und um die Nucleoli herum zu erkennen sind und den Übergang zur mittleren S-Phase anzeigen. In der sich anschließenden späten S-Phase stellen die DNA-Ligasel-Foci ebenfalls Heterochromatin-Bereiche dar. Die Dynamik dieser Verteilung ist mit der von PCNA vergleichbar (Kapitel 2.7.2.2). Bei Eintritt in die G2-Phase verschwindet dieses Muster, da das Protein im ganzen Kern der Zelle verteilt vorliegt. Nach der sich anschließenden, morphologisch leicht zu erkennenden Mitose folgt die G1-Phase, in der das Protein ebenfalls über den gesamten Zellkern verteilt ist (Easwaran *et al.*, 2005).

2.8 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Zur Erhaltung ihrer genomischen Integrität ist es für die Zelle von größter Wichtigkeit, schwerwiegende Schäden wie DSBs zu reparieren, bevor sie sich teilt und die Schäden an folgende Generationen weitergegeben werden. Für die Reparatur der Schäden wird der Zelle an Kontrollpunkten im Zellzyklus, den Checkpoints, Zeit zur Verfügung gestellt. Solche Checkpoints existieren am Übergang zwischen G1- und S-Phase, innerhalb der S-Phase und zwischen der G2-Phase und der Mitose. Allerdings wurde beobachtet, dass der G2/M-Checkpoint zwar schnell aktiviert wird, aber insensitive ist und Zellen mit 10 bis 20 DSBs in die folgende Zellzyklus-Phase entlässt, was dem zuvor vorgestellten Konzept widerspricht. Der G1/S-Checkpoint hingegen gilt als „Master-Checkpoint“, der Zellen schon mit einem bis wenigen DSBs arretiert. Da noch wenig zur zeitlichen Regulation des G1/S-Checkpoints in Gegenwart von DSBs nach IR bekannt ist, sollte im ersten Teil der Arbeit zunächst der zeitliche Ablauf seiner Aktivierung und das Aufheben untersucht werden. Weiterhin sollte auch die Sensitivität des Checkpoints analysiert werden, um festzustellen, mit wie vielen unreparierten DSBs der Arrest überwunden und auch wieder aufgehoben wird. Dazu sollten Untersuchungen in

lebenden Zellen mittels LCI durchgeführt werden. Die Verifizierung der Ergebnisse erfolgte über „klassische“ Methoden wie Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz-Mikroskopie.

Darüber hinaus beschäftigt sich die Arbeit mit der Charakterisierung des G1/S-Checkpoints nach Modifizierung des Schadenssignals. Hierfür werden die Zellen mit UVC-Licht bestrahlt, wodurch vor allem CPDs und 6-4PPs induziert werden. Nach Bestrahlung wird ebenfalls die zeitliche Regulation des Einsetzens des G1/S-Checkpoints untersucht und mit den Ergebnissen nach IR verglichen. Da eine Beschreibung des G2/M-Checkpoints in Bezug auf das Einsetzen und die Sensitivität nach IR bereits vorliegt, wird ergänzend dazu eine Charakterisierung nach Bestrahlung der Zellen mit UVC vorgenommen. Ein weiterer Aspekt bei der Darstellung der Checkpoint-Induktion ist die Einordnung der Sensor-Kinasen ATM und ATR. Nachdem bei IR und dem Auftreten von DSBs vornehmlich ATM aktiviert wird, erfolgt nach Bestrahlung mit UVC in erster Linie die Aktivierung von ATR. Durch die Verwendung ATM- und ATR-defizienter Zellen und spezifischen Inhibitoren soll Einblick in die ATM- bzw. ATR-Abhängigkeit der G1/S- und G2/M-Checkpoint-Induktion nach IR und UVC-Bestrahlung gewonnen werden.

Ferner wird auch die Bedeutung einer Phosphorylierung von H2AX für den Checkpoint-Arrest nach UVC-Bestrahlung analysiert. Nach IR ist die Schadens-Antwort der Zelle bereits gut untersucht. Nach Auftreten von DSBs erfolgt die Erkennung über ATM und die Phosphorylierung von H2AX zu γ -H2AX in kurzer Zeit. Durch Rekrutierung weiterer Proteine erfolgt die Induktion einer DNA-Schadensantwort und eines Checkpoints. Über die Phosphorylierung von H2AX nach UVC-Bestrahlung existieren widersprüchliche Aussagen, weshalb dieser Gesichtspunkt im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls überprüft wird.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und verwendete Materialien

3.1.1 Geräte

Autoklav	VX-150	(Systec GmbH, Wetterberg)
Brutschränke	HERA cell 240	(Thermo Scientific, Langenselbold)
Chemilumineszenz-Gerät	Chemismart5000	(Vilber-Lourmat, Eberhardzell)
Dosimeter	Diados	(PTW, Freiburg)
Durchflusszytometer	FACS Scan™ FC500	(Becton Dickinson, Heidelberg) (Beckman Coulter, Krefeld)
Durchlicht-Mikroskop	Eclipse TS100	(Nikon, Düsseldorf)
Elektrophoresekammern für Agarose-Gele	Sunrise™, Horizon 58	(Gibco BRL, Gaithersburg, USA)
Elektroporator	Nucleofector, amaxa	(Lonza Cologne AG, Köln)
Fluoreszenz-Mikroskope	Axioplan2 Observer D1	(Zeiss, Jena) (Zeiss, Jena)
Heizblock	Thermomixer compact	(Eppendorf, Hamburg)
Kryotanks	Locator 8 Plus	(Thermolyne, Dubuque, USA)
Kühlzentrifugen	5804R und 5810R Rotor A-4-44 und A-4-81	(Eppendorf, Hamburg) (Eppendorf, Hamburg)
<i>Live Cell Imaging</i> -System	AxioVert 200M	(Zeiss, Jena)
	Incubator XL-3	(Pecon, Erbach)
	<i>tempcontrol 37-2 digital</i>	(Pecon, Erbach)
	<i>CO₂-controller</i>	(Pecon, Erbach)
	CCD-Kamera (CV-M4+CL)	(JAI, Großwallstadt)
	Motorisierter Scanning-Tisch	(Märzhäuser, Wetzlar)
Mikroskopfilter	EGFP ET Filterset	(AHF Analysentechnik AG, Tübingen)
	Texas Red ET Filterset	(AHF Analysentechnik AG, Tübingen)
	Cy5 Filter	(AHF Analysentechnik AG, Tübingen)
	DAPI ET Filterset	(AHF Analysentechnik AG, Tübingen)
Objektive	Plan-Neofluar 10x	(Zeiss, Jena)
	Plan-Apochromat 10x	(Zeiss, Jena)
	Plan-Neofluar 40x	(Zeiss, Jena)
	Plan-Neofluar 63x	(Zeiss, Jena)
	Plan-Neofluar 100x	(Zeiss, Jena)
PCR Gerät	T1 Thermocycler	(Biometra, Göttingen)
Photometer	Ultrospec 3000 pro	(Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, GB)
Pipetten	pipetman 1µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	(Abimed, Langenfeld)

Power Supply	Power Pac 300	(BioRad, München)
Präzisionswaagen	TE1502S und TE153S-DS	(Sartorius mechatronics, München)
Reinstwasseranlage	Astacus BI µS MT	(MembraPure GmbH, Bodenheim)
Röntgenröhre	MCN 165/796704	(Philips, Hamburg)
	Isovolt Titan E	(GE, München)
Sterilwerkbänke	Hera safe	(Thermo Scientific, Langenselbold)
Tiefkühltruhe (-80°C)	Hera freeze	(Thermo Scientific, Langenselbold)
Tischzentrifugen	Heraeus Biofuge pico	(Kendro, Osterode)
	5415C	(Eppendorf, Hamburg)
Ultraschallstab	Sonopuls GM 70	(Bandelin, Berlin)
UV Crosslinker	UVC 500	(Hoefer, Inc., Holliston, USA)
Vortexer	Genie 2	(Scientific Industries, Bohemia, USA)
Wasserbad	WB14	(Memmert, Schwabach)
Western Blot-System		(Hoefer, Inc., Holliston, USA)
Zählkammern	Neubauer-improved	(Marienfeld GmbH & CoKG, Lauda-Koenigshofen)

3.1.2 Verbrauchsmaterial

µ-slide VI	(ibidi, München)
6-, 12-, 24 und 96-well Platten	(TPP, Trasadingen, CH und Greiner bio-one, Frickenhausen)
Deckgläser Ø 12 mm	(Roth, Karlsruhe)
Drigalski-Spatel	(Roth, Karlsruhe)
Impföse	(Roth, Karlsruhe)
Kryoröhrchen Cellstar®, 5 ml	(Greiner bio-one, Frickenhausen)
Objektträger SuperFrost®, 76x26 mm	(Menzel-Gläser, Braunschweig)
Pasteurpipetten 150 mm	(Roth, Karlsruhe)
Petrischalen	(Greiner bio-one, Frickenhausen)
Pipettenspitzen 10 µl, 20 µl, 1000 µl	(Sarstedt, Nümbrecht)
Reagenzgläser	(Roth, Karlsruhe)
Reaktionsgefäße, 1,5 ml, 2 ml	(Roth, Karlsruhe)
Rundbodenröhrchen BD Falcon™, 5 ml	(BD Biosciences, Heidelberg)
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	(TPP, Trasadingen, CH)
Zellkulturschalen 8,8 cm ² und 21,5 cm ²	(nunc, Langenselbold, TPP, Trasadingen, CH)
Zellkulturschalen, Ø 100x20 mm	(TPP, Trasadingen, CH)
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	(TPP, Trasadingen, CH, Sarstedt, Nümbrecht Orange Scientific, Braine-l'Alleud, B)

3.2 Chemikalien und Lösungen

3.2.1 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	(Sigma, Steinheim)
10x PBS Instamed-Pulver	(Biochrom AG, Berlin)
Aceton	(Roth, Karlsruhe)
Agar-Agar	(Roth, Karlsruhe)
Agarose	(Roth, Karlsruhe)
Aphidicolin 1 mg/ml	(Calbiochem/Merck, Darmstadt)
APS (Ammoniumpersulfat)	(Roth, Karlsruhe)
ATM-Inhibitor	(Calbiochem/Merck, Darmstadt)
Bacto-Pepton	(BD Biosciences, Heidelberg)
Bradford-Reagenz	(Biorad, München)
BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin, 10 mg/ml) in PBS	(BD Pharmingen™, BD Biosciences, Heidelberg)
Bromphenolblau	(Merck, Darmstadt)
BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>)	(AppliChem, Darmstadt, PAA, Cölbe)
Calciumchlorid	(Roth, Karlsruhe)
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid, 1 mg/ml) in MilliQ	(Sigma, Steinheim)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	(Roth, Karlsruhe)
DNase, 1mg/ml in 50% Glycerin	(Roche, Mannheim)
DNA-PK-Inhibitor (NU 7026)	(Tocris, Ellisville, USA)
DTT (Dithiothreitol)	(Sigma, Steinheim)
Dulbecco's MEM Medium	(Biochrom AG, Berlin)
EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridin, 10 µM) in DMSO, Click-iT™ Kit	(Invitrogen, Karlsruhe)
Effectene Transfection Reagent	(QIAGEN, Hilden)
Elektroporations-Lösung (Solution V)	(Lonza Cologne AG, Köln)
Essigsäure	(Roth, Karlsruhe)
Ethanol, reinst > 99,8%	(Appllichem, Darmstadt)
Ethanol, vergällt	(Roth, Karlsruhe)
Ethidiumbromid, 10 mg/ml	(Roth, Karlsruhe)
FCS (Fötales Kälberserum)	(Biochrom AG, Berlin)
Flow-Check™ Fluorospheres	(Beckman Coulter, Krefeld)
Formaldehyd, 37%	(Roth, Karlsruhe)
Glycerin	(Roth, Karlsruhe)
Glycin	(Sigma, Steinheim)
Hefe-Extrakt	(Roth, Karlsruhe)
HiMark™ Prestained HMW Protein Standard	(Millipore GmbH, Schwalbach)
Image-iT™ FX Signal Enhancer	(Invitrogen, Karlsruhe)
Isopropanol	(Roth, Karlsruhe)

Kaliumacetat	(Sigma, Steinheim)
Kaliumhydroxid	(Roth, Karlsruhe)
Kristallviolett	(Sigma, Steinheim)
Magermilchpulver	(Roth, Karlsruhe)
Manganchlorid	(Roth, Karlsruhe)
Methanol	(Roth, Karlsruhe)
Minimal Essential Medium (MEM) Earle	(Biochrom AG, Berlin)
MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure)	(Sigma, Steinheim)
Mounting Medium, Vectashield®	(Vector Laboratories, Burlingame, USA)
NaCl (Natriumchlorid)	(Roth, Karlsruhe)
Natrium-Tetraborat-Decahydrat	(Roth, Karlsruhe)
Nocodazol, 500 µg/ml in DMSO	(Sigma, Steinheim)
Non-essential amino acids (NEAA)	(Biochrom AG, Berlin)
Penicillin-Streptomycin (100 units/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin)	(Biochrom AG, Berlin)
Ponceau S	(Sigma, Steinheim)
Propidiumiodid	(Fluka Chemika AG, Buchs, CH)
RNaseA, 10mg/ml in PBS, hitzeinaktiviert	(Sigma, Steinheim)
Rotiphorese® Gel 30	(Roth, Karlsruhe)
RPMI 1640 Medium	(Biochrom AG, Berlin)
Rubidiumchlorid	(Sigma, Steinheim)
Salzsäure, 37% (10 M, 2 M)	(Roth, Karlsruhe)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	(Merck, Darmstadt)
Silikon Öl AR200	(Fluka Chemika AG, Buchs, CH)
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	(Roth, Karlsruhe)
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	(Roth, Karlsruhe)
Triton X-100	(Roth, Karlsruhe)
Tween®20	(Sigma, Steinheim)

3.2.2 Lösungen

1x PBS, pH 7,45	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
1x PBS/1 % FCS	1x PBS 1% FCS (hitzeinaktiviert) in MilliQ
1x TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8 1 mM Na ₂ -EDTA

5x Laemmli-Probenpuffer	300 mM Tris/HCL pH 6,8 10 % SDS 25 % 2-Mercaptoethanol 50 % Glycerin 0,02 % Bromphenolblau
5x Running Buffer	0,25 M Tris 1,92 M Glycin
5% BSA-Lösung in 1x PBS/1 % FCS	5 g BSA 100 ml 1x PBS/1 % FCS
Antikörper-Lösung	1 % Magermilchpulver 0,1 % Tween®20 in 1x PBS
Blockpuffer	5 % Magermilchpulver 0,1 % Tween®20 in 1x PBS
Blotpuffer für SDS-PAGE	200 ml Running Buffer (5x) 600 ml H ₂ O bidest 200 ml MetOH 5 ml 10 % SDS
Click-iT™-reaction cocktail (500µl)	430 µl Click-iT™ reaction buffer (Komponente D) 20 µl CuSO ₄ (Komponente E) 1,2 µl Alexa (Komponente B) 50 µl reaction buffer 1:10 in MilliQ (Komponente F)
Einfriermedium	60 % FCS 20 % (v/v) Zellkulturmedium 20% (v/v) DMSO
Elektrophoresepuffer (1x)	25 mM Tris/HCL pH 8,8 0,2 M Glycin 0,5 % SDS (w/v)
Ethidiumbromid-Färbegrad	1 µg/ml Ethidiumbromid in 0,5x TBE
Gellösung B	1,5 M Tris/HCL pH 8,8 14 mM SDS
Gellösung C	495 mM Tris/HCL pH 6,8 14 mM SDS
Inkubationspuffer BrdU	60 mM Tris 0,6 mM MgCl ₂ 1 mM 2-Mercaptoethanol 1 µg/ml DNase

Laufpuffer für SDS-PAGE	200 ml Running Buffer (5x) 800 ml H ₂ O bidest 10 ml 10 % SDS
Lysepuffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0 150 mM NaCl 0,5 % Natriumdesoxycholat 1 % Triton X-100 0,1 % SDS vor Verwendung Zugabe von 1/25 Volumen Proteaseinhibitor
Natrium-Tetraborat-Decahydrat	3,81 g in 100 ml MilliQ, pH 8,5
PonceauS	0,5 % PonceauS (w/v) in 1 % Essigsäure
Propidiumiodid-Lösung	0,1 mg/ml in 1x PBS
Trypsin-EDTA-Lösung	0,1% Trypsin 0,5 mM Na ₂ -EDTA, pH 8 in 1x PBS
Transferpuffer (1x)	20 mM Tris/HCl pH 8,3 150 mM Glycin
Waschpuffer (TBS-T)	0,1 % Tween®20 in 1x PBS

3.3 Antikörper

3.3.1 Primärantikörper

anti-53BP1, mouse, monoclonal, IgG1, 200 µg/235 µl	(Millipore GmbH, Schwalbach)
anti-53BP1, rabbit, polyclonal, IgG 0,1 ml	(Biomol, Hamburg)
anti-ATM, mouse, monoclonal	(Abcam, Cambridge, UK)
anti-ATR, rabbit, polyclonal	(Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
anti-BrdU, mouse, monoclonal	(Becton Dickinson, Heidelberg)
anti-CENP-F, rabbit, polyclonal IgG 200 µg/ml	(Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
anti-PCNA, mouse, monoclonal IgG _{2a} 200 µg/ml	(Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
anti-phospho Histone H3 (Ser 10), mouse, monoclonal	(Cell Signaling Technology, Danvers, USA)
anti-phospho Histone H3 (Ser 10), rabbit, polyclonal	(Millipore GmbH, Schwalbach)
anti-γ-H2AX (Ser 139), mouse, monoclonal; IgG 2 µg/ml	(Millipore GmbH, Schwalbach)
anti-γ-H2AX (Ser 139), rabbit, polyclonal, 1 mg/ml	(Abcam, Cambridge, GB)
FITC-conjugated mouse anti-BrdU, monoclonal IgG ₁	(Becton Dickinson, Heidelberg)

3.3.2 Sekundärantikörper

Alexa Fluor®488 goat-anti-rabbit IgG	(Invitrogen, Karlsruhe)
Alexa Fluor®488 goat-anti-mouse IgG	(Invitrogen, Karlsruhe)
Alexa Fluor®594 goat-anti-rabbit IgG	(Invitrogen, Karlsruhe)
Alexa Fluor®594 goat-anti-mouse IgG	(Invitrogen, Karlsruhe)
Alexa Fluor®647 goat-anti-mouse IgG	(Invitrogen, Karlsruhe)

3.3.3 Plasmide

GFP-53BP1

Der GFP-gekoppelte Reparaturfaktor 53BP1 wurde freundlicherweise von Claudia Lukas zur Verfügung gestellt (Bekker-Jensen *et al.*, 2005).

RFP-Ligasel

Das RFP-gekoppelte Protein Ligasel zur Identifizierung der S-Phase wurde freundlicherweise von M. Cristina Cardoso zur Verfügung gestellt (Easwaran *et al.*, 2005).

3.4 Kits

Amaya®Cell Line Nucleofector® Kit V und R	(Lonza Cologne AG, Köln)
Click-iT™ EdU Alexa Fluor®549 Imaging Kit	(Invitrogen, Karlsruhe)
Lumilight-Kit	(Roche, Mannheim)
Nucleobond AX PC500	(Macherey-Nagel, Düren)
peqGold Plasmid Miniprep Kit II	(peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
QIAprep®Spin Miniprep Kit (50)	(QIAGEN, Hilden)
QIAquick®Gel Extraction Kit (50)	(QIAGEN, Hilden)
QIAquick®PCR Purification Kit (50)	(QIAGEN, Hilden)

3.5 Antibiotika

Ampicillin	(Serva, Heidelberg)
G418	(Calbiochem/Merck, Darmstadt)
Kanamycin	(Roth, Karlsruhe)
Plasmocin	(Lonza Cologne AG, Köln)
Tetrazyklin	(Serva, Heidelberg)

3.6 Software

ACDsee 9 Foto Manager	(ACD Systems International Inc., Victoria, CDN)
Axiovision	(Zeiss, Jena)
Cell Quest	(Becton Dickinson, Heidelberg)
CorelDRAW Graphics Suite X3	(Corel Corporation, Ottawa, Canada)
CXP Analysis	(Beckman Coulter, Krefeld)
Image J	(National Institutes of Health, Bethesda, USA)
Metafer4	(MetaSystems, Altlußheim)

3.7 Mikrobiologische Methoden

3.7.1 Verwendete *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme von *E. coli*

Bezeichnung	Genotyp	Relevanter Phänotyp	Referenz
<i>E. coli</i> sure	e14–(McrA–) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1, lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan ^r) uvrC [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10, (Tet ^r)]	Kan ^r , Tet ^r	Greener (1990)
<i>E. coli</i> DH5α	Δ(lac) U169, end A1, gyr A96, hsd R17, Φ80Δ(lacZ)M15, rec A1, rel A1, sup E44, thi-1	Amp ^r	Sambrook <i>et al.</i> (1989)
<i>E. coli</i> XL-1 blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA lac [F'proAB lacqZ M15 Tn10 (Tet ^r)]	Tet ^r	Bullock <i>et al.</i> (1987)

r = resistant

3.7.2 Nährmedium zur Anzucht von *E. coli*

Tab. 2: Zusammensetzung LB-Medium

Komponente	Menge
Bacto-Pepton	10 g
Hefe Extrakt	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O bidest.	ad 1000 ml, autoklavieren

Zur Herstellung von LB-Platten wurden 1 L des LB-Mediums (Luria-Bertani-Medium) Bertani (1951) vor dem Autoklavieren 15 g Agar zugesetzt.

3.7.3 Antibiotika

Tab. 3: Zur Selektion von *E. coli* verwendete Antibiotika

Antibiotika	Stammlösung (mg/ml)	Endkonzentration (µg/ml)	Lösungsmittel
Ampicillin	100	100	H ₂ O
Kanamycin	30	30	H ₂ O
Tetrazyklin	20	20	H ₂ O:Ethanol (50:50)

3.7.4 Anzucht und Wachstum von *E. coli*

Zum Wachstum auf Festmedien wurden Glycerinkulturen bzw. Kolonien von Agarplatten mit einer Impföse auf einer frischen Agarplatte ausgestrichen oder entsprechende Mengen von Flüssigkulturen mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert und bei 37°C inkubiert.

Zur Anzucht von *E. coli* in Flüssigkulturen wurden Einzelkolonien mittels eines sterilen Zahnstochers in Flüssigmedium überimpft und bei 37°C schüttelnd inkubiert.

Den jeweiligen Medien wurden den Resistenzen der Bakterienstämme entsprechend Antibiotika zugefügt.

3.7.5 Stammkonservierung von *E. coli*

Zur Herstellung von Glycerinkulturen aus *E. coli* Stämmen wurden Einzelkolonien mit einem sterilen Zahnstocher von einer Agarplatte abgenommen und in 5 ml LB-Medium, dem entsprechend der Resistenz des jeweiligen Stammes Antibiotika zugesetzt wurden, auf einem Schüttler bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 1 inkubiert. Die exponentiell wachsenden Kulturen wurden mit Glycerin versetzt (10% Glycerin final), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80°C gelagert.

3.7.6 Transformation von *E. coli*

3.7.6.1 Herstellung kompetenter Zellen

Tab. 4: Zusammensetzung Puffer 1

Komponenten	Menge
30 mM KOAc	6 ml einer 4 M Lösung
100 mM RbCl ₂	80 ml einer 1 M Lösung
10 mM CaCl ₂	8 ml einer 1 M Lösung
50 mM MnCl ₂	40 ml einer 1 M Lösung
15% Glycerin	240 ml 50% Glycerinlösung
H ₂ O bidest.	ad 800 ml

Der pH des Puffers 1 wurde mit Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt und der Puffer anschließend sterilfiltriert.

Tab. 5: Zusammensetzung Puffer 2

Komponenten	Menge
10 mM MOPS	1 ml einer 1 M Lösung
75 mM CaCl ₂	7,5 ml einer 1 M Lösung
10 mM RbCl ₂	1 ml einer 1 M Lösung
15% Glycerin	30 ml 50% Glycerinlösung
H ₂ O bidest.	ad 800 ml

Der pH des Puffer 2 wurde mit KOH auf pH 6,5 eingestellt und der Puffer anschließend sterilfiltriert.

Kompetente *E. coli* Zellen wurden nach Hanahan (Hanahan, 1983) präpariert. Dazu wurde der betreffende *E. coli* Stamm auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht (ÜN) bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden 10 ml LB-Medium mit dem Stamm angeimpft und bei 37°C ÜN schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 200 ml LB-Medium in einem 2 L Erlenmeyerkolben mit 2 ml der ÜN-Kultur angeimpft und bei 37°C schüttelnd bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,7 inkubiert. Nach dem Umfüllen der Zellkultur in 50 ml Zentrifugenröhrchen und 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde in der Eppendorf Zentrifuge 5804R im Rotor A-4-44 bei 4500xg für 5 min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die pelletierten Zellen in 80 ml kaltem Puffer 1 resuspendiert, wobei die Zellen zunächst in etwa 10 ml Puffer mit einer Glaspipette resuspendiert und anschließend mit dem restlichen Volumen des Puffers 1 aufgefüllt wurden. Nach erneuter 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden die resuspendierten Zellen bei 4500xg und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Zellen in 8 ml kaltem Puffer 2 resuspendiert. Die Suspension wurde zu je 100 µl in zuvor gekühlten Reaktionsgefäßen aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80°C gelagert.

3.7.6.2 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation (Chung *et al.*, 1989) wurden 100 µl kompetente *E. coli* Zellen langsam auf Eis aufgetaut und 0,1 - 0,5 µg DNA bzw. 5 - 10 µl Ligationsansatz zu den Zellen gegeben und gemischt. Der Transformationsansatz wurde 30 min auf Eis gehalten, danach für 90 s auf 42°C erhitzt (Hitzechock) und anschließend wieder auf Eis gestellt. Zur phänotypischen Expression wurde 1 ml LB-Medium hinzugefügt, der Ansatz in Glasröhrchen überführt und für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Der im Glasröhrchen befindliche Ansatz wurde komplett in ein Reaktionsgefäß überführt, bei 10000xg für 1 min abzentrifugiert und das entstandene Pellet in etwa 100 µl Restmedium resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden auf einer LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und bei 37°C ÜN inkubiert.

3.8 Molekularbiologische Methoden

3.8.1 Plasmid-Minipräparation aus *E. coli*

Zur schnellen Präparation kleiner Plasmid-Mengen aus *E. coli* wurde das QIAprep®Spin Miniprep Kit der Firma QIAGEN, Hilden, verwendet. Die Bakterien werden unter alkalischen Bedingungen lysiert (Birnboim und Doly, 1979) und das Lysat in einem weiteren Schritt neutralisiert. Anschließend kann die Plasmid-DNA über eine Anionenaustauscher-Säule unter geeigneten niedrigen Salz- und pH-Bedingungen gebunden werden. Kontaminationen wie RNA, Proteine, Farbstoffe und weitere niedrigmolekulare Verunreinigungen werden durch eine mittlere Salzkonzentration entfernt. Anschließend wird die Plasmid-DNA eluiert.

Mit diesem Protokoll können bis zu 20 µg high-copy Plasmid-DNA aus 1 bis 5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* Zellen aufgereinigt werden.

2 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* wurden abzentrifugiert (10000xg, 3 min, RT), das Bakterienpellet in 250 µl Puffer P1 aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 250 µl Puffer P2 wurde das Reaktionsgefäß zur Durchmischung der Komponenten 4 bis 6 Mal invertiert und anschließend 350 µl Puffer N3 zupipettiert. Nach 4- bis 6-maligem Invertieren des Reaktionsgefäßes wurde das Lysat bei 17900xg für 10 min abzentrifugiert und der Überstand auf eine QIAprep Spin-Säule überführt. Nach Zentrifugation der Säule bei 17900xg für 1 min wurde der Durchfluss verworfen und die Säule mit 750 µl Puffer PE gewaschen, indem wiederum bei 17900xg 1 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und zur vollständigen Entfernung des Waschpuffers von der Säule noch einmal 1 min zentrifugiert. Die QIAprep Säule konnte nun in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und das Plasmid durch Zugabe von 20 µl bis 50 µl Puffer EB oder RNase-freiem Aqua dest. nach 1 min Wartezeit durch einminütige Zentrifugation bei 17900xg eluiert werden. Die Menge und Reinheit der DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Um eine Kontamination mit Proteinen auszuschließen, wurde gleichzeitig die Extinktion bei 280 nm gemessen und der Quotient der Absorptionen OD_{260}/OD_{280} gebildet, der zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte.

Ansatz zur Messung der DNA-Konzentration im Photometer: 2 µl DNA + 98 µl H₂O

Berechnung:

$$\text{DNA – Konzentration (mg/ml)} = \frac{E_{260 \text{ nm}} * 50 * \text{Verdünnungsfaktor}}{1000}$$

3.8.2 Plasmid-Maxipräparation aus *E. coli*

Die Plasmid-Präparation aus *E. coli* erfolgte mittels Nucleobond AX Kit von Macherey-Nagel, Düren ebenfalls nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979), bei der die Zellwand der

Bakterien durch Lysozym und die anschließende Zugabe von SDS und NaOH geschädigt wird. In dem so entstandenen sehr basischen Lysat denaturiert die chromosomale DNA, allerdings nicht die ringförmigen Plasmide. Durch Natriumacetat wird das Lysat neutralisiert, die chromosomale DNA kann sich nicht renaturieren und fällt, ebenso wie Proteine und RNA aus und wird durch Filtration entfernt. Die löslichen, ringförmigen Plasmide werden an eine der im Kit beigefügten Säulen gebunden. Das Plasmid wird anschließend eluiert und präzipitiert.

Für die Plasmidisolierung wurden Zellen einer 200 ml ÜN-Kultur in LB-Medium verwendet. Nach dem Abzentrifugieren (5000xg für 10 min bei 4°C) wurde das erhaltene Bakterienpellet vorsichtig in 12 ml stets kühl gehaltenem Puffer S1 resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 12 ml Puffer S2, die sofortige Mischung der Suspension durch 6- bis 8-maliges Umdrehen des Zentrifugenbechers und 5-minütige Inkubation bei RT.

Die Präzipitation der chromosomalen DNA fand nach Zugabe von 12 ml Puffer S3 statt. Die Suspension wurde nochmals vorsichtig durch 6- bis 8-maliges Umdrehen gemischt, bis sich eine homogene Suspension gebildet hatte, die 5 min auf Eis inkubiert wurde. Das durch Puffer S3 ausgefallene SDS sollte nicht auf die Säule geladen werden, da sie verstopfen könnte. Der filtrierte Durchfluss musste aus diesem Grunde klar sein. War dies nicht der Fall, wurde er nochmals filtriert.

Zur Klärung des bakteriellen Lysats wurde ein Faltenfilter verwendet, optional konnte auch zentrifugiert werden. Ein im Kit enthaltener Faltenfilter wurde in einen Trichter gelegt, mit Wasser oder Puffer N2 angefeuchtet und der Durchfluss in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen.

Die Säule wurde durch Zugabe von 6 ml Puffer N2 equilibriert, das geklärte Lysat auf die equilibrierte Säule geladen und der Durchfluss verworfen. Bei diesem Schritt fand die Adsorption des Plasmids an die Membran statt. Die Säule wurde mit 32 ml des Puffers N3 gewaschen und die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer N5 eluiert.

Um die Plasmid-DNA zu präzipitieren, wurden 11 ml Isopropanol (RT) zu der eluierten Lösung gegeben, beides in ein Zentrifugenröhrchen gefüllt und bei > 15000xg 30 min bei 4°C zentrifugiert. Zur Erhöhung der Ausbeute an DNA wurde das nach der Zentrifugation erhaltene DNA-Pellet mit 1 ml 70% Ethanol (RT) gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Zentrifugenröhrchen wurde anschließend nochmals mit 900 µl Isopropanol gereinigt, danach mit 100 µl Wasser gespült und in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Beide Reaktionsgefäße wurden bei 1600xg 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die erhaltenen Pellets wurden getrocknet und in 50 µl TE-Puffer oder RNase-freiem Aqua dest. gelöst (Inkubation 3 min bei 55°C und 30 min bei 37°C). Die DNA wurde auf einem Agarosegel überprüft. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch wie unter 3.8.1 beschrieben.

3.9 Proteinanalytische Methoden

3.9.1 Ernte und Lyse der Zellen zur Gewinnung von Gesamtprotein

Zum Nachweis von Proteinen wurden Zellen entsprechender Zelllinien in Zellkultur-Schalen ausgesät und 48 h inkubiert. Zur Ernte der Zellen wurde das Medium abgenommen, die Zellen 1 Mal mit 10 ml PBS gewaschen, erneut 10 ml kaltes PBS auf die Zellen gegeben und der Zellrasen mit einem

Schaber vom Boden der Zellkultur-Schale abgeschabt und im PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen 10 min bei 300xg und 4°C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 200 µl Lysepuffer aufgenommen, der Zellaufschluss erfolgte über die Sonifizierung mittels eines Ultraschallstabes (2 Mal 10 s). Die lysierten Zellen wurden 30 min auf Eis gehalten und anschließend 30 min bei 13000xg und 4°C abzentrifugiert, um feste Zellbestandteile abzutrennen. Vom Lysat wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt, anschließend konnte der Überstand in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei - 20°C eingefroren werden. Eine längere Lagerung der Gesamtproteine erfolgte bei - 80°C.

Das Prinzip der Proteinbestimmung nach Bradford basiert auf einem Farbumschlag des Farbstoffs Coomassie-Brillant-Blau von rot (ungebundene Form) mit Absorptionsmaximum bei 470 nm zu blau (Komplexbildung mit Proteinen) und einer Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm durch die Komplexbildung wird gegen den ungebundenen Farbstoff gemessen und ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Zur Proteinbestimmung wurde 1 µl des Zelllysats in 800 µl H₂O gegeben. Nach Zugabe von 200 µl Bradford-Reagenz wurde die Probe gevortext und bei RT 5-10 min inkubiert. Als Kontrolle wurden 2 µl Lysepuffer in 800 µl Aqua dest. gegeben und ebenfalls 200 µl Bradford-Reagenz zupipettiert. Die Messung der Absorption der Proben erfolgte am Photometer bei 595 nm. Die erhaltenen Extinktions-Werte wurden mit einer BSA-Eichkurve verglichen und die Proteinkonzentration ermittelt.

3.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse der Proteine wird die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgt über ein Polyacrylamid-Gel. Proteine besitzen von Natur aus je nach Aminosäure-Zusammensetzung verschiedene isoelektrische Punkte und unterschiedliche Sekundärstrukturen. Durch die Zugabe des Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) werden nicht-kovalente Wechselwirkungen im nativen Protein zerstört, die Eigenladung der Proteine wird überdeckt und sie weisen eine konstant negative Ladung auf. Sie können dadurch unabhängig von Ladung und Struktur allein anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Die Zugabe von 2-Mercaptoethanol zu den Proben dient der Zerstörung der Disulfidbrücken. Zusätzlich werden die Proteine durch Hitze denaturiert, somit gestreckt, und entsprechend ihrer Länge aufgetrennt.

In der SDS-Gelelektrophorese werden zwei Arten von Gelen kombiniert. Das Sammelgel mit einem Tris-HCl-Puffer-System ist weitporig (meist 5%ig) und dient der Konzentration der Probe. Glycinat-Ionen, die als Zwitterionen vorliegen (Gly +/-), dienen als Folge-Ionen, Chlorid-Ionen dienen als Leit-Ionen, da sie schneller als die Glycinat-Ionen zum positiven Pol wandern. Zwischen diesen beiden Ionenarten bewegen sich die Proteine und gelangen gemeinsam an das Trenngel. Das Trenngel (Tris-HCl-Puffer-System pH 8,8) ist engporig (7 %ig bis 16 %ig) und trennt die Proteine auf. Beim pH-Sprung von Sammel- auf Trenngel entstehen Glycinat-Anionen, die sich zu den Chlorid-Ionen orientieren und ebenfalls schnell zur Anode laufen. Die Proteine werden nach ihrer Größe aufgetrennt.

Zur Auftrennung der Proteine ATM und ATR wurde ein 7 %-iges Trenngel (Zusammensetzung siehe Tab. 6) in Kombination mit einem Sammelgel (Zusammensetzung siehe Tab. 7) in einem Elektrophorese-System der Firma Hoefer verwendet.

Zum Gießen des Gels wurden zunächst zwei Glasplatten in die Apparatur gespannt und das Trenngel bis etwa 1,5 cm unterhalb der Stelle gegossen, wo später der Kamm für die Aussparung der Taschen endete. Das Gel wurde mit Isopropanol überschichtet und zum Polymerisieren 1 h bei Raumtemperatur stehen lassen. Danach wurde das Isopropanol abgegossen. Das Sammelgel wurde nach dem Auspolymerisieren des Trenngels gegossen und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Dieser wurde nach dem Polymerisieren (30 min) entfernt. Das Gel wurde in der Elektrophoresekammer fixiert, die Kammer mit Laufpuffer befüllt und die Taschen für die Proben mit Puffer gespült.

Die unter 3.9.1 vorbereiteten Proben wurden mit 5-fach Laemmli-Puffer versetzt, 5 min bei 80 °C erhitzt und nach kurzem Abzentrifugieren zusammen mit einem Proteinstandard zur Größenbestimmung (HiMark™Prestained HMW Protein Standard) auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für etwa 2 h bei 125 V. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Kammer entfernt, die Glasplatten vorsichtig abgenommen und das Sammelgel abgetrennt. Das Gel konnte so für die Analyse im Western Blot (siehe Kapitel 3.9.3) eingesetzt werden.

Tab. 6: Polyacrylamidgel (7 %)

Komponente	Volumen
H ₂ O bidest	5,1 ml
30% AA:0,8% BAA (Rotiphorese®Gel 30)	2,3 ml
Gellösung B	2,5 ml
10 % SDS	100 µl
10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl

Tab. 7: Sammelgel

Komponente	Volumen
H ₂ O bidest	9,0 ml
30% AA:0,8% BAA (Rotiphorese®Gel 30)	2,2 ml
Gellösung C	3,8 ml
10 % APS	100 µl
TEMED	40 µl

3.9.3 Western Blot

Der Western Blot bezeichnet das Übertragen oder „*blotten*“ von Proteinen, welche z.B. über SDS-PAGE aufgetrennt wurden, auf eine Trägermembran. Anschließend können die Proteine auf der Membran mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden.

Das Polyacrylamid-Gel mit den aufgetrennten Proteinen wurde hierzu luftblasenfrei auf die Nitrozellulose-Membran gebracht und jeweils auf das Gel bzw. unter die Membran 3 in Transferpuffer getränkte Filterpapiere und 1 ebenfalls in Transferpuffer getränkter Schwamm gelegt. Dieser Auf-

bau (Tank-Blot-Verfahren) wurde in die Kammer eingesetzt und diese mit Blotpuffer aufgefüllt. Anschließend wurde ein elektrisches Feld senkrecht zum Gel angelegt. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte mit einer Stromstärke von 80 mA über Nacht bei 4°C.

Zur Überprüfung der Proteinübertragung wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt. Nach anschließender Entfärbung in einem Wasserbad wurde die Membran 1 h bei 4°C in Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Nach zwei Waschschritten von je 10 min mit TBS-T schloss sich die Inkubation der Membran mit der primären Antikörperlösung für ATM (mouse monoclonal, 1:500 in Antikörper-Lösung) oder ATR (rabbit polyclonal, 1:500 in Antikörper-Lösung) über Nacht bei 4°C an. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS-T für jeweils 10 min folgte die Inkubation mit der sekundären Antikörperlösung (goat-anti-mouse 1:10000 und goat-anti-rabbit 1:30000) für 1 h bei RT. Der Nachweis der Proteine erfolgte nach 3 Waschschritten mit TBS-T für je 10 min durch ein Chemilumineszenz-Reagenz (Lumilight Kit, Roche). Die Komponenten Luminol und Enhancer-Lösung wurden kurz vor Verwendung nach Angaben des Herstellers 1:1 gemischt und die Membran 1 min mit der Lösung inkubiert. Die Detektion des mit Meerrettichperoxidase konjugierten Zweit-Antikörpers erfolgte am Chemismart5000.

3.10 Zellbiologische Methoden

3.10.1 Zelllinien

AT1BR

Diese humanen, primären Hautfibroblasten sind ATM-defizient (Henderson, 1985). Die Zellen wurden freundlicherweise von P. A. Jeggo (Genome Damage and Stability Centre, University of Sussex) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in HAM's F10-Medium mit 15 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin. Die Zellen wurden zweimal pro Woche 1:2 gesplittet.

AT7Bi

AT7Bi sind primäre, humane Hautfibroblasten mit einem defekten ATM-Gen. Sie wurden freundlicherweise von P. A. Jeggo (Genome Damage and Stability Centre, University of Sussex) bereit gestellt (Stiff *et al.*, 2004). Die Kultivierung erfolgte in HAM's F10-Medium mit 15 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin. Die Zellen wurden zweimal pro Woche 1:3 gesplittet.

U2OS

Die Osteosarkom-Linie U2OS ist chromosomal stark verändert. Es sind nur wenige normale Chromosomen zu finden, allerdings wurde eine hohe Anzahl stabiler Marker-Chromosomen identifiziert (Landers *et al.*, 1997). Zudem wurden sie als p53 und auch G1/S-Checkpoint-profizient beschrieben (Nghiem *et al.*, 2001). Die Zelllinie wurde von ATCC (American Type Culture Collection) bezogen. Die Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10 % FCS, 1 % NEAA und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert und einmal pro Woche 1:10 gesplittet.

hTert-Zelllinien

Primäre humane Zellen sind nur zu einer begrenzten Anzahl von Zellteilungen fähig und erreichen letztendlich ein Stadium, das als replikative Seneszenz bezeichnet wird. Die Zellen teilen sich nicht mehr aufgrund der Verkürzung der Telomere. Um diesen Alterungsprozess aufzuhalten, wurden die Zellen über Retroviren mit Vektoren transfiziert, welche die *human Telomerase reverse transcriptase* (hTert) codieren. Auf diese Weise immortalisierte Zellen zeigen verlängerte Telomere, starke Teilungsfähigkeit und eine schwache β -Galactosidase-Färbung, ein Biomarker für Seneszenz (Bodnar *et al.*, 1998).

2BNhTert oder P2hTert

2BN ist eine humane, primäre Hautfibroblasten-Zelllinie, die ebenso die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase stabil exprimiert (Dai *et al.*, 2003). Die Zellen zeigen eine verminderte Fähigkeit bei der V(D)J-Rekombination, sind sehr strahlenempfindlich und haben einen Defekt in der Komponente XLF/Cernunnos des NHEJ. Die Zellen wurden freundlicherweise von P. A. Jeggo (Genome Damage and Stability Centre, University of Sussex) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in MEM mit 20 % FCS, 1 % NEAA und 1 % Penicillin/Streptomycin (100 units/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin) kultiviert und einmal pro Woche 1:3 gesplittet.

82-6hTert

82-6hTert sind humane Hautfibroblasten, die den hTert-Vektor tragen. Die Zellen wurden freundlicherweise von P. A. Jeggo (Genome Damage and Stability Centre, University of Sussex) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in MEM mit 20 % FCS, 1 % NEAA und 1 % Penicillin/Streptomycin (100 units/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin). Für Transfektionen mit Plasmid-DNA wurden die Zellen ohne Antibiotikum kultiviert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich 1:3 gesplittet.

F02-98hTert

Ebenso wie bei den zuvor genannten Zellen handelt es sich bei F02-98hTert um eine humane, primäre Fibroblasten Zelllinie, welche mit dem hTert-Vektor transfiziert und somit immortalisiert wurde. Die Zellen wurden einem Patienten mit Seckel-Syndrom entnommen (Goodship *et al.*, 2000). Die Kultivierung der Zelllinie erfolgte in MEM mit 20 % FCS. Sie wurde zweimal pro Woche 1:3 gesplittet. Die Zellen wurden freundlicherweise von P. A. Jeggo (Genome Damage and Stability Centre, University of Sussex) zur Verfügung gestellt.

3.10.2 Kultivierung der Zellen

Die adhärent wachsenden Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5 % in feuchter Atmosphäre kultiviert, bis eine Konfluenz von 80 % erreicht wurde. Anschließend wurden die Zellen passagiert, dazu wurde das verbrauchte Zellkulturmedium steril abgesaugt und die Zellen mit PBS (RT) gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkultur-Flaschen wurden die Zellen für etwa 10 min bei 37°C mit Trypsin-EDTA-Puffer inkubiert. Die abgelösten Zellen

wurden anschließend in vorgewärmtem Medium (37°C) aufgenommen, je nach Zelllinie in einem entsprechendem Verhältnis gesplittet und in frische Zellkulturgefäße überführt.

Für Experimente mit dem *Live Cell Imaging*-Verfahren (siehe Kapitel 3.12.4) wurden 8×10^3 - 1×10^4 82-6hTert-Zellen in 30 µl Medium in einem Kanal eines µ-Slides VI (ibidi) ausgesät. In die beiden Mediumreservoirs rechts und links des Kanals wurden 50 µl Medium pipettiert und die Oberfläche zum Schutz gegen Verdunstung mit einem Tropfen Silikonöl überschichtet. Das µ-slide VI wurde anschließend im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Für Immunfluoreszenz-Experimente wurden die Zellen in 60 mm Zellkulturschalen auf runde Deckgläschen (U2OS 5×10^5 Zellen, 82-6hTert $2,5 \times 10^5$ Zellen) ausgesät. Für Experimente mittels Durchflusszytometrie wurden $1,8 \times 10^5$ - $2,5 \times 10^5$ primäre Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen bzw. für Durchflusszytometrie-Experimente mit UVC-Bestrahlung $1,8 \times 10^5$ Zellen in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät. Für Durchflusszytometrie-Experimente mit Tumorzellen (U2OS) wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in kleinen Zellkulturflaschen ausgesät.

3.10.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzählung erfolgte mittels einer Neubauer-Kammer (Neubauer-improved) der Firma Marienfeld GmbH und Co. KG. Unter das Deckglas wurden 10 µl Zellsuspension pipettiert und die Anzahl der Zellen in einem Kleinquadrat, bestehend aus 16 Kleinstquadraten, ausgezählt. Die Fläche eines Kleinstquadrates beträgt 0,0025 mm², die Tiefe der Kammer 0,1 mm. Daraus ergibt sich nach folgender Formel die Zelldichte pro ml in der Zellsuspension:

$$\text{Zellen pro ml} = \frac{\text{Anzahl Zellen}}{16 * 0,0025 \text{ mm}^2 * 0,1 \text{ mm}}$$

Um die Fehlerrate zu verringern, wurden die Zellen in 4 Kleinquadraten ausgezählt und die Zellzahl durch 4 dividiert.

3.10.4 Steriles Einfrieren von Zellen

Um stets auf Zellen mit niedrigen Passagen zurückgreifen zu können, wurden diese durch eine Lagerung über einen langen Zeitraum in flüssigem Stickstoff bei - 196°C kryokonserviert. Eine kurzfristige Lagerung war auch bei - 80°C möglich. Die einzufrierenden Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in der Zellkulturflasche abtrysiniert (siehe 3.10.2) und in Zellkultur-Medium aufgenommen. Mittels Neubauer-Zählkammer wurde die genaue Zellzahl bestimmt und die Zellsuspension bei 4°C und 300xg für 10 min abzentrifugiert. Die pro Kryoröhrchen einzufrierende Zellmenge sollte zwischen 1×10^6 und 2×10^6 Zellen liegen. Die Zellen wurden in 0,9 ml kaltem Kulturmedium resuspendiert und auf Eis gestellt. Zu dieser Zellsuspension wurde nochmals die gleiche Menge an gekühltem Einfriermedium (siehe 3.2.2) tropfenweise zugegeben, mit der Pipette einmal gut

durchmischt und in ein 1,8 ml Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden in einer Styroporbox im - 80°C Gefrierschrank abgekühlt und nach zwei Tagen in den Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

3.10.5 Auftauen von Zellen

Die Kryoröhrchen mit den Zellen wurden dem Stickstofftank entnommen, im Wasserbad bei 37°C etwa 2 min aufgetaut und der Inhalt in ein mit 10 ml Medium befülltes 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Dieses wurde 10 min bei 4°C und 300xg zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 6 ml frischem, vorgewärmten Medium aufgenommen, in eine kleine Zellkulturflasche überführt und bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte entweder ein Wechsel des Mediums, oder die Zellen wurden bei ausreichender Konfluenz gesplittet.

3.10.6 Transfektion der Zellen

Das Prinzip der Transfektion besteht darin, fremde Moleküle wie DNA oder RNA in prokaryotische oder eukaryotische Zellen einzuschleusen, um die Expression von Genen zu untersuchen und zu kontrollieren. Klonierte Gene/Plasmide wie z.B. GFP-53BP1 können in die Zellen transfiziert werden, um sie biochemisch zu charakterisieren oder die Effekte der Gen-Expression auf das Zellwachstum und das Voranschreiten im Zellzyklus zu beobachten.

Man unterscheidet zwischen transienter und stabiler Transfektion. Bei der transienten Transfektion wird die DNA in den Zellkern eingeschleust, aber nicht in das Genom integriert. Nach einigen Zellteilungen geht die transfizierte DNA wieder verloren. Im Gegensatz dazu wird bei einer stabilen Transfektion die DNA in die chromosomale DNA der Zelle integriert.

3.10.6.1 Chemische Transfektion mit Effectene Transfektions-Reagenz (QIAGEN)

Die von der Firma QIAGEN entwickelte Methode beruht auf dem Prinzip Liposomen-vermittelter Transfektionstechnik. Die im Kit enthaltene Komponente Effectene ist aus nicht liposomalen polykationischen Lipiden zusammengesetzt und in der Lage, Mizellen zu bilden. Die positiv geladene Oberfläche der Mizelle interagiert mit dem negativ geladenen Phosphat-Rückgrat der DNA, wodurch ein schwach positiv geladener Komplex gebildet wird, der an der negativ geladenen Oberfläche der Zellmembran bindet und bei der Zellteilung ins Zellinnere aufgenommen werden kann.

Für die transiente Transfektion mit dem Plasmid RFP-Ligasel in U2OS-Zellen wurden 4x10⁴ U2OS-Zellen pro Vertiefung einer 24-well-Platte ausgesät. 24 h später wurde die Transfektion nach Anleitung des Herstellers unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden 0,3 µg DNA mit EC-Puffer auf 60 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach Zugabe von 1,6 µl Enhancer wurde der Ansatz für 1 s gevortext und bei Raumtemperatur für 2 bis 5 min inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 5 µl des Transfektionsreagenz Effectene. Der Ansatz wurde für 10 s gevortext und nochmals 5 bis 10 min bei RT inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Zellen in den 24-well-Schalen mit 700 µl PBS

gewaschen und 350 µl frisches, 37°C warmes Zellkulturmedium zugegeben. Der Transfektionsansatz wurde ebenfalls in 350 µl Medium aufgenommen und tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach leichtem Schwenken der Platte zur Verteilung der Transfektionskomplexe wurden die Zellen 24 h zur Expression des Proteins im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen abtrypsinisiert und 8×10^3 bis 1×10^4 Zellen pro Kanal eines µ-slide VI ausgesät.

3.10.6.2 Elektroporation von 82-6hTert-Zellen

Das Elektroporationsgerät „Nucleofector“ der Firma Lonza ermöglicht es, primäre Zelllinien einfach zu transfizieren. Bei dieser Methode werden elektrische Parameter mit Zelltyp-spezifischen Lösungen kombiniert und so auf den individuellen Zelltyp abgestimmt. Die DNA gelangt nach einem elektrischen Impuls, bei dem sich die Membranporen des Zellkerns öffnen, direkt in den Zellkern und man ist nicht auf sich teilende Zellen wie bei anderen Techniken, z.B. der chemischen Transfektion, angewiesen. Daher ergeben sich relativ hohe Transfektions-Effizienzen für schwer transfizierbare Zellen. Durch die direkte Einbringung der DNA in den Zellkern wird auch die Zeit bis zur Expression des gewünschten Proteins verkürzt.

Vor Elektroporation der Zellen sollte darauf geachtet werden, dass die Kultur 2 bis 3 Tage zuvor passagiert wurde und am Tag des Versuches 70 %-85 % konfluent war, da eine höhere Zelldichte die Transfektionseffizienz herabsetzen kann, ebenso wie das Alter der Kultur. Außerdem sollte die Kultur mykoplasmenfrei sein, da eine Verunreinigung mit diesen Bakterien die Effizienz ebenfalls negativ beeinflusst. Die verwendeten Zellen wurden deshalb vorsorglich mit Plasmocin behandelt. Die Plasmocinbehandlung erfolgte über einen Zeitraum von 2 Wochen, wobei die Zellen alle 3 bis 4 Tage gesplittet wurden bzw. das Medium gewechselt wurde und man 1 µl Plasmocin/ml Medium zusetzte. Um auch nach diesen 2 Wochen die Kultur mykoplasmenfrei zu halten, erfolgte eine ständige Zugabe von 0,2 µl Plasmocin/ml Medium beim Passagieren der Zellen. Ebenfalls einen großen Einfluss auf die Transfektionseffizienz bzw. das Überleben der Zellen hat die Qualität und Konzentration der DNA. Die DNA sollte endotoxinfrei sein, also mit einem entsprechenden Kit aufgereinigt (QIAGEN Endofree Plasmid Kit), und in deionisiertem Wasser oder TE-Puffer mit einer Konzentration von 1 bis 5 µg/µl aufgenommen werden. Die Reinheit der Plasmidpräparation sollte photometrisch über das A260:A280 Verhältnis bestimmt werden. Das beste Verhältnis für die Elektroporation liegt bei 1,8.

Zur Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen, abtrypsinisiert, in Medium aufgenommen und $1,5 \times 10^6$ Zellen in ein Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt und bei Raumtemperatur und 90xg für 10 min abzentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden 3 µg der zu transfizierenden Plasmide (RFP-Ligasel oder RFP-Ligasel zusammen mit GFP-53BP1 im Verhältnis 1:3) in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Ebenfalls wurde 500 µl RPMI-Medium ohne Zusätze in einem Reaktionsgefäß vorgelegt, um darin Zellen nach der Elektroporation für 30 min zu inkubieren. Die *Nucleofector Solution V* wurde auf Raumtemperatur erwärmt. Nach Abzentrifugieren der Zellen wurde das überstehende Medium abgesaugt, die Zellen in 100 µl Lösung V aufgenommen, einmal vorsichtig auf- und abpipettiert und mit dem Plasmid gemischt. Die Suspension mit Plasmid wurde luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette pipettiert, im Nucleofector-Gerät platziert und ein Puls gesetzt (Programm

U-030 oder T-030). Nach Ende der Elektroporation wurden die Zellen sofort mit 37°C warmen RPMI-Medium überschichtet und mittels einer Pasteur-Pipette in ein Reaktionsgefäß überführt. Dort wurden die Zellen 30 min bei 37°C inkubiert, bevor sie in eine 6-well Schale mit 37°C warmen MEM-Medium mit 20 % FCS ausgesät wurden.

3.10.7 Bestrahlung der Proben

3.10.7.1 Bestrahlen mit ionisierender Strahlung

Die Bestrahlung der Proben erfolgte mit der Röntgenröhre MCN 165/796704 der Firma Philips oder der Röntgenröhre Isovolt Titan E der Firma GE mit einer Beschleunigungsspannung von 90 kV und einer Stromstärke von 19 mA. Die Dosisleistung wurde durch Fricke-Dosimetrie ermittelt und betrug bei der Röntgenröhre MCN 165/796704 2,0794 Gy/min bei einer Einstellung von 90 kV, 19 mA und einem Abstand zur Strahlungsquelle von 30 cm. Bei der Röntgenröhre Isovolt Titan E betrug die Dosisleistung bei gleicher Einstellung und gleichem Abstand zur Quelle 3,0348 Gy/min. Zur Filterung der Strahlung wurden die Zellen auf einer 1 mm dicken Aluminiumplatte platziert und auf einer Höhe von 30 cm über dem Berylliumfenster bestrahlt. Mit diesen Einstellungen wurden sowohl Zellen auf Glas-Deckgläschen als auch auf Plastik wie Zellkulturflaschen und μ -slides IV bestrahlt. Glas hat eine höhere Ordnungszahl als Plastik. Somit entstehen bei der Bestrahlung von Zellen auf Deckgläschen Sekundärelektronen, welche die Zellen zusätzlich schädigen, aufgrund ihrer geringen Reichweite jedoch nicht von Dosimetern erfasst werden. Glas besteht hauptsächlich aus Silizium mit einer Atomzahl Z von 14. Die Anzahl der bei der Bestrahlung entstehenden Sekundärelektronen hängt stark von der Atomzahl ab. Bestrahlung von Materialien mit hoher Ordnungszahl bedingt mehr Sekundärelektronen als die Bestrahlung von Materialien mit niedriger Ordnungszahl, die die Zellen stärker schädigen (Kegel *et al.*, 2007).

Da bei der Bestrahlung auf Glas somit etwa die zweifache Menge an Doppelstrangbrüchen durch zusätzlich entstehende Sekundärelektronen als auf Plastik erscheinen, wurde die applizierte Dosis bei auf Glas bestrahlten Experimenten etwa halbiert, um sie mit den auf Plastik bestrahlten Experimenten vergleichen zu können.

3.10.7.2 Bestrahlung mit UVC

Zur Bestrahlung der Zellen mit UVC wurde das Gerät UVC 500 der Firma Hoefer verwendet. Um störende Einflüsse durch das Medium auszuschließen, wurde das Medium vor der Bestrahlung abgesaugt. Die Proben für Überlebensexperimente wurden mit den Fluenzen 3 J/m², 6 J/m², 9 J/m², 12 J/m², 15 J/m² und 30 J/m² bestrahlt. Für Proben für die Durchflusszytometrie und bei der Doppelmarkierung der Zellen mit EdU und BrdU wurden Fluenzen von 3 J/m², 6 J/m² und 12 J/m² verwendet.

3.10.8 Behandlung von Zellen mit Inhibitor

Durch Behandlung der Zellen mit spezifischen Inhibitoren wurden bestimmte Proteine gehemmt. Verwendet wurden der ATM-Inhibitor (ATMi) von Calbiochem und der DNA-PK-Inhibitor (DNA-PKi) von Tocris. Der ATM-Inhibitor wirkt selektiv als ATP-kompetitiver Inhibitor der ATM-Kinase. Er inhibiert ATM-abhängige Protein-Phosphorylierung nach ionisierender Strahlung. DNA-PKi wirkt als spezifischer Inhibitor der katalytischen Untereinheit von DNA-PK.

Der ATMi lag in einer Stocklösung von 10 mM in DMSO vor und wurde in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt, der DNA-PKi lag ebenfalls in einer Stocklösung von 10 mM in DMSO vor und wurde in einer Konzentration von 20 μ M eingesetzt. Die Zugabe der Inhibitoren erfolgte 30 min vor Behandlung (IR oder Bestrahlung mit UVC) und sie verblieben bis zur Fixierung der Zellen im Medium.

3.10.9 Überlebensexperimente

Mit Hilfe von Überlebensexperimenten (*Cell Survival Assays*) soll die Zahl proliferierender Zellen, hier nach Bestrahlung mit UVC oder IR, gemessen werden. Puck und Marcus entwickelten diese „einfache, schnelle Methode des Wachstums von einzelnen Säugerzellen zu makroskopischen Kolonien...“ (Puck und Marcus, 1956) in Anlehnung an Plattierungsverfahren von Mikrobiologen oder Plaque-Tests aus der Virologie. Die Ermittlung des klonogenen Zellüberlebens gilt als methodischer „Goldstandard“ für Experimente in der Strahlenbiologie.

Als klonogen bezeichnet man Zellen, welche auch nach Bestrahlung über reproduktive Integrität und Proliferationsfähigkeit zur Bildung von Klonen oder Kolonien verfügen (Hall, 2006).

Zu Beginn des Experiments wurde von der im Versuch verwendeten Zelllinie die *Plating Efficiency* (PE) ermittelt. *Plating Efficiency* beschreibt den Prozentsatz von Zellen, die sich nach der Aussaat mit oder ohne Bestrahlung im neuen Kulturgefäß absetzen, sich teilen und Kolonien bilden. Die Zellen wurden trypsiniert, in Medium resuspendiert, gezählt und eine bestimmte Anzahl in Zellkulturschalen ausgesät (siehe 3.10.2 und 3.10.3), sodass eine für die Auswertung optimale Anzahl an Kolonien entsteht. Dabei wurde für jeden Punkt eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Als Kolonien wurden Zellansammlungen gewertet, die nach einer bestimmten, für jede Zelllinie individuellen Wachstumszeit mindestens 50 Zellen enthielten. Die Wachstumszeit der hier verwendeten 82-6hTert und F02-98hTert-Zellen betrug 11 Tage. Die Kolonien wurden in einem Schritt fixiert und gefärbt, indem man das Medium aus den Zellkulturschalen absaugte und eine Lösung aus 0,1 % Kristallviolett in 25 % Ethanol in die Schalen gab, bis deren Boden vollständig bedeckt war. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Schalen so lange unter fließendem VE-Wasser gespült, bis die Kolonien auf dem Boden der Kulturschale klar hervortraten. Kleinere Kolonien wurden nicht in die Auswertung mit einbezogen. Die *Plating Efficiency* errechnete sich somit aus dem Verhältnis der gezählten Kolonien zur Anzahl der ausgesäten Zellen.

$$PE = \frac{\text{Anzahl gezählter Kolonien}}{\text{Anzahl ausgesäter Zellen}} * 100$$

Wurden die Zellen bestrahlt, errechnet sich die *Surviving Fraction* (SF) aus der PE nach Bestrahlung und der PE der Kontrollen.

$$SF = \frac{\text{Anzahl gezählter Kolonien}}{\text{Anzahl ausgesäter Zellen} * \left(\frac{PE}{100}\right)}$$

Die SF wurde innerhalb eines Bereichs unterschiedlicher Bestrahlungsdosen bestimmt und anhand einer Überlebenskurve (*Survival Curve*) dargestellt. Die Dosis wurde hierbei linear, die SF logarithmisch aufgetragen.

3.11 Immunfluoreszenz-Färbung

Durch die Methode der Immunfluoreszenz ergibt sich die Möglichkeit, bestimmte Proteine in der Zelle zu untersuchen. Nach Fixierung der Zellen auf Deckgläschen können die Antigene mit Hilfe von primären Antikörpern nachgewiesen werden, dessen konstanter Fc-Teil wiederum von einem sekundären Antikörper erkannt wird. Der sekundäre Antikörper ist mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt, z.B. Alexa Fluor®488 oder Alexa Fluor®594, und kann im Fluoreszenzmikroskop durch Anregung mit Licht verschiedener Wellenlängen sichtbar gemacht werden. Zur Identifizierung der Zellen und auch, um den DNA-Gehalt in Scanning-Anwendungen abschätzen zu können, wurden die Zellkerne mit DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) gefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff wird schnell von den Zellen aufgenommen und lagert sich spezifisch an die DNA, hier vor allem an AT-reiche Regionen. Das Absorptionsmaximum liegt bei 358 nm, das Emissionsmaximum bei 461 nm (Wilson *et al.*, 1990).

In den Experimenten wurden entweder exponentiell auf Deckgläschen oder in μ -slides VI wachsende Zellen verwendet, die nach Bestrahlung (siehe 3.10.7.1) fixiert und in einer feuchten Kammer gefärbt wurden.

3.11.1 Fixierung

3.11.1.1 Methanol-Fixierung

Die Zellen wurden mit 100 % Methanol für mindestens 30 min bei - 20°C fixiert. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 100 % Aceton für 1 min bei - 20°C. Bei der alleinigen PCNA-Immunfluoreszenz wurde der Permeabilisierungsschritt nicht durchgeführt, da dies innerhalb der Zelle zu einer verstärkten Aggregatbildung der Proteine führte. Die Zellen wurden an-

schließlich dreimal mit PBS/1 % FCS gewaschen und konnten bis zur Färbung bei 4°C aufbewahrt werden.

3.11.1.2 Formaldehyd-Fixierung

Die Fixierung erfolgte mit einer 3,7 %-igen in PBS hergestellten Formaldehyd-Lösung. Die Zellen wurden 10 min bei Raumtemperatur mit der Lösung überschichtet und anschließend 3 Mal 10 min mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung wurden die Zellen in einer 0,2 %-igen Triton-X 100-Lösung in PBS/1 % FCS für 5 min bei 4°C inkubiert oder in einer 0,1 %-igen Triton-X 100-Lösung für 20 min bei RT inkubiert und dreimal mit PBS/1 % FCS gewaschen. In dieser Lösung konnten die Zellen bis zur Färbung bei 4°C aufbewahrt werden.

3.11.2 Färbung

Nach Fixierung der Zellen wurden entsprechend dem nachzuweisenden Protein verschiedene Vorgehensweisen zur Färbung der Proteine verwendet. Die verwendeten primären und sekundären Antikörper und ihre jeweiligen Verdünnungen sind in Tab. 8 und Tab. 9 dargestellt.

Tab. 8: Primäre Antikörper

Antikörper	Herkunft	Firma	Verdünnung
anti-BrdU	mouse	Becton-Dickinson	1:50 (1 h, 37°C)
BrdU-FITC conjugated	rabbit	BD Pharmingen	20 µl/Probe
anti-53BP1	mouse	Upstate/Millipore	1:500 (1 h, RT)
anti-53BP1	rabbit	Biomol	1:1000 (ÜN, 4°C)
anti-CENP-F	rabbit	Santa Cruz Biotechnology	1:500 (1 h, RT)
anti-PCNA	mouse	Santa Cruz Biotechnology	1:1000 (ÜN, 4°C)
anti-γ-H2AX	mouse	Millipore	1:1000 (1 h, RT)
anti-γ-H2AX	rabbit	Abcam	1:1000 (1 h, RT) 1:1500 (ÜN, 4°C)

Tab. 9: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Herkunft	Firma	Verdünnung
goat-anti-mouse Alexa Fluor®594	mouse	Invitrogen	1:500 (1h, RT)
goat-anti-rabbit Alexa Fluor®594	rabbit	Invitrogen	1:500 (1h, RT)
goat-anti-mouse Alexa Fluor®488	mouse	Invitrogen	1:500 (1h, RT)
goat-anti-rabbit Alexa Fluor®488	rabbit	Invitrogen	1:500 (1h, RT)
goat-anti-mouse Alexa Fluor®647	mouse	Invitrogen	1:200 (1h, RT)

3.11.2.1 Färbung mit PCNA zur Identifizierung von S-Phase-Zellen

Um unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper auszuschließen, wurden die Methanol-fixierten Zellen 30 min in 5 % BSA-Lösung geblockt. Die Deckgläschen wurden anschließend in einer feuchten Kammer mit 20 µl einer 1:1000 Verdünnung in 5 % BSA-Lösung des primären anti-PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) Antikörpers (mouse monoclonal) überschichtet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen 4 Mal jeweils 5 min mit PBS/1 % FCS und 1 Mal 10 min mit PBS gewaschen. Darauf folgte die Inkubation mit 30 µl des sekundären Antikörpers Alexa Fluor®594 goat-anti-mouse (1:500 in 5 % BSA) für 1 h bei Dunkelheit und Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Nach 3-maligem Waschen für 10 min mit PBS erfolgte die unspezifische DNA-Färbung mit 0,2 µg/ml DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) für 4 min. Das Auflegen der Deckgläschen mit 3 µl Mounting Medium auf die Objektträger konnte nach 1-maligem Waschen für 10 min mit PBS erfolgen. Nach dem Trocknen wurden die Deckgläschen auf den Objektträgern noch mit klarem Nagellack versiegelt und die Objektträger bis zur Auswertung bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Die gleiche Färbung mit allen Schritten wurde auch bei Zellen durchgeführt, die im µ-slide VI (ibidi) ausgesät wurden. In die einzelnen Kanäle der µ-slides VI wurde nach Ende der Färbung Mounting Medium pipettiert.

Auswertung der PCNA-gefärbten Zellen:

Die Färbung von PCNA diente der Identifizierung der S-Phase, da PCNA in der G1- als auch der G2-Phase nur diffus im Zellkern verteilt vorliegt, während es bei der Synthese der DNA in der S-Phase an den Orten der DNA-Replikation akkumuliert. Dadurch ergibt sich ein charakteristisches Muster, welches in der frühen S-Phase in Form fein verteilter Punkte im ganzen Zellkern zu erkennen ist. Die mittlere S-Phase ist dadurch gekennzeichnet, dass die Punkte des Musters insgesamt größer sind

und sich nun vor allem am Rand des Zellkerns und um die Nucleoli herum anordnen. Gegen Ende der S-Phase erscheinen die Punkte am größten und sind unregelmäßig im Zellkern verteilt.

3.11.2.2 Identifizierung von G1- und G2-Phase-Zellen

Bei der Auswertung von Reparaturkinetiken wurde zwischen Zellen der G1- und G2-Phase unterschieden. Dies ermöglichte die Färbung der Zellen gegen CENP-F (Centromerprotein F), wodurch Zellen der späten S-Phase und der G2-Phase identifiziert werden können. Die Kernfärbung der G2-Phase ist dabei deutlich stärker als die der S-Phase. Die Färbung gegen CENP-F wurde in Experimenten verwendet, in denen nur ein Protein über einen monoclonalen mouse-Antikörper identifiziert wurde. Bei der Doppelfärbung mit CENP-F wurde der Antikörper gegen das zu identifizierende Protein wie in 3.11.2.3 und 3.11.2.4 beschrieben und zusätzlich anti-CENP-F, rabbit, polyclonal in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt.

Bei der gleichzeitigen Identifizierung von γ -H2AX und einem weiteren Protein wurde eine Unterscheidung der Zellzyklus-Phase über die Intensität des DAPI-Gehalts vorgenommen. G2-Phase-Zellen zeigen ein intensiveres DAPI-Signal durch ihren höheren DNA-Gehalt als G1-Phase-Zellen, der DNA-Gehalt und damit auch das DAPI-Signal von S-Phase-Zellen liegt zwischen dem von G1- und G2-Phase-Zellen. Zudem wiesen S-Phase-Zellen nach Aphidicolin-Behandlung (3 μ g/ml) und Bestrahlung eine pannukleäre γ -H2AX-Färbung auf und konnten somit ausgeschlossen werden. Die Auswertung der DAPI-Intensität erfolgte über die Software Metafer von MetaSystems, wobei die Zellen automatisch über eine Kamera am Mikroskop eingescannt wurden und die Intensität des DAPI-Signals gegen die Intensität des γ -H2AX-Signals in einem Diagramm dargestellt wurde. Zellen der G1- und G2-Population konnten anhand des Diagramms ausgewählt und über eine Relokierungsfunktion des Metafer-Programms auf dem Deckglas gefunden und ausgewertet werden.

3.11.2.3 γ -H2AX-Färbung

Die Färbung gegen γ -H2AX wurde vor allem verwendet, um Kontrollexperimente, wie z.B. Reparaturkinetiken oder die Kolokalisation der Proteine auszuwerten. Sie erfolgte je nach Fragestellung entweder nur gegen γ -H2AX, zusammen mit 53BP1, oder in Verbindung mit GFP-53BP1 transfizierten Zellen.

Nach Fixierung der Zellen mit Formaldehyd und dreimaligem Waschen mit PBS/1 % FCS wurde zur alleinigen Färbung mit γ -H2AX 20 μ l des Antikörpers anti- γ -H2AX (Ser 139), mouse, monoclonal in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS/1 % FCS für 1 h bei RT auf die Zellen gegeben. Nach 3-maligem Waschen mit PBS/1 % FCS für jeweils 10 min wurden 30 μ l der sekundären Antikörper-Lösung Alexa Fluor®488 goat-anti-mouse in einer Verdünnung von 1:500 in PBS/1 % FCS für 1 h bei RT auf die Zellen gegeben und anschließend 3 Mal 10 min mit PBS gewaschen.

Bei gleichzeitiger Färbung von GFP-53BP1 transfizierten Zellen mit γ -H2AX erfolgte die Färbung, wie zuvor beschrieben, als sekundärer Antikörper gegen γ -H2AX wurde Alexa Fluor®594 goat-anti-mouse gewählt.

Bei der Doppelfärbung von γ -H2AX und 53BP1 wurden die primären Antikörper anti- γ -H2AX (Ser 139), rabbit, polyclonal (1:1000) und anti-53BP1, mouse, monoclonal (1:500) für 1 h bei RT eingesetzt.

Zum Abschluss erfolgte die unspezifische Färbung der DNA mit 0,2 μ g/ml DAPI-Lösung für 4 min, anschließend wurden die Deckgläschen mit den Zellen 1 Mal für 10 min mit PBS gewaschen und mit je 3 ml Mounting-Medium auf Objektträger gelegt und nach dem Trocknen mit Nagellack versiegelt. Die gleiche Färbung mit allen Schritten wurde auch bei Zellen durchgeführt, die im μ -slide VI (ibidi) ausgesät wurden.

3.11.2.4 53BP1-Färbung

Die Färbung gegen 53BP1 wurde nach demselben Schema wie die Färbung gegen γ -H2AX durchgeführt. Der primäre Antikörper (anti-53BP1, mouse, monoclonal) wurde hierbei 1:500 in PBS/1 % FCS verdünnt und 1 h bei RT auf die Zellen gegeben, als sekundärer Antikörper wurde Alexa Fluor®488 goat-anti-mouse in einer Verdünnung von 1:500 in PBS/1 % FCS verwendet.

Auswertung der γ -H2AX- und 53BP1-Foci:

Um das Reparaturvermögen der Zellen quantifizieren zu können, wurde die Abnahme von γ -H2AX- bzw. 53BP1-Foci untersucht, welche ein Maß für DNA-Doppelstrangbrüche darstellen. Die Foci wurden mikroskopisch bei 630-facher Vergrößerung getrennt in G1- und G2-Phase-Zellen ausgewertet. Standardmäßig wurden bei den bestrahlten Proben die Foci in 40 Zellen ausgezählt und die Werte gemittelt. Bei den unbestrahlten Kontrollen wurden so viele Zellen gezählt, bis 40 Foci erreicht waren. Anschließend wurde die Focizahl durch die erreichte Zellzahl dividiert, um die Anzahl an Hintergrundfoci zu ermitteln. Dieser Kontrollwert wurde von den ausgezählten Mittelwerten der bestrahlten Proben abgezogen.

3.11.2.5 53BP1- und PCNA-Doppelfärbung

Nach der Methanol-Fixierung und Permeabilisierung mit Aceton wurden die Deckgläschen 3 Mal 10 min in PBS/1 % FCS gewaschen und mit den primären Antikörpern anti-PCNA (mouse, monoclonal 1:1000 in PBS/1 % FCS) und anti-53BP1 (rabbit, polyclonal 1:1000 in PBS/1 % FCS) in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 4 Mal 5 min in PBS/1 % FCS und 1 Mal 10 min in PBS gewaschen, bevor in einer feuchten Kammer die 1-stündige Inkubation mit den sekundären Antikörpern Alexa Fluor®594 goat-anti-mouse (1:500 in PBS/1 % FCS) und Alexa Fluor®488 goat-anti-rabbit (1:500 in PBS/1 % FCS) erfolgte. Nach 3-maligem Waschen für 10 min mit PBS wurden die Zellkerne mit 0,2 μ g/ml DAPI-Lösung gefärbt, die Deckgläschen mit Mounting-Medium auf Objektträger gelegt und versiegelt.

Eine identische Färbung mit allen Schritten wurde auch bei Zellen durchgeführt, die im μ -slide VI (ibidi) ausgesät und fixiert wurden.

3.11.2.6 Anti-Phospho H3-Färbung zur Untersuchung des G2/M-Checkpoints

Zwei Tage vor Beginn des Versuchs wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen verschiedener Zelllinien, hier 82-6hTert als Wildtyp (WT), F02-98hTert als ATR-defiziente Mutante und AT7Bi als ATM-defiziente Mutante in mittleren Schalen, in denen Deckgläschen ausgelegt waren, ausgesät. Am Tag des Versuchs wurden je 3 Deckgläschen pro Zelllinie für die Erntezeitpunkte 0 h, 1 h und 2 h in ein kleines Schälchen mit entsprechendem Medium überführt. Nach Abnahme des Mediums wurde wie unter 3.10.7.2 beschrieben mit 3 J/m^2 , 6 J/m^2 und 12 J/m^2 bestrahlt, wobei zu jedem Zeitpunkt eine unbestrahlte Kontrolle mitgeführt wurde. Die Röntgenbestrahlung erfolgte wie unter 3.10.7.1 beschrieben mit 1 Gy und 2 Gy. Hier wurde ebenfalls eine unbestrahlte Kontrolle mitgeführt. Direkt nach Bestrahlung wurde der Polymerase-Inhibitor Aphidicolin zu den Zellen gegeben, um bestrahlte S-Phase-Zellen aus der Auswertung ausschließen zu können. Für die Dauer der Reparatur wurden die Zellen bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Fixierung und Permeabilisierung der 0 h Punkte erfolgte unmittelbar nach Bestrahlung mit 3,7 %-iger Formaldehyd-Lösung und 0,1 %-iger Triton-X 100-Lösung. Ebenso wurden die Zellen nach 1 h und 2 h Reparaturzeit fixiert und anschließend 3 Mal mit PBS/1 % FCS gewaschen. Die Färbung erfolgte mit 20 µl einer monoklonalen phospho-H3 Antikörper-Lösung (Ser 10) in der Verdünnung 1:1000 in PBS/1 % FCS für 1 h bei RT. Nach 3-maligem Waschen mit PBS/1 % FCS wurde als sekundärer Antikörper Alexa Fluor®594 goat-anti-mouse für 1 h in der Verdünnung 1:500 in PBS/1 % FCS auf die Zellen gegeben. Abschließend erfolgte die unspezifische DNA-Färbung mit 0,2 µg/ml DAPI-Lösung. Zur Untersuchung der Ausbildung von DSBs durch UVC-Bestrahlung oder IR, wurden die Zellen in einem parallelen Ansatz mit dem primären Antikörper anti-γ-H2AX (Ser 139), (mouse, monoclonal, Verdünnung 1:1000 in PBS/1 % FCS) 1 h bei RT inkubiert und mit dem sekundären Antikörper Alexa Fluor®488 goat-anti-mouse (1:500 in PBS/1 % FCS, 1 h bei RT) gefärbt. Die Deckgläschen wurden anschließend mittels Mounting-Medium auf Objektträger gebracht und versiegelt.

Auswertung der anti-phospho H3 markierten und γ-H2AX gefärbten Zellen:

Die gefärbten Zellen wurden mittels 10x Objektiv und der Software Metafer der Firma MetaSystems abgescannt. Dabei wurden die rot gefärbten phospho H3-positiven Zellen (Aufnahme mit Texasred-Filter) gegen die DAPI-Färbung aufgetragen. So konnte die Gesamtzellzahl und die Zahl der phospho H3-positiven Zellen, welche den G2/M-Übergang anzeigen, ermittelt werden. Ebenso wurden die mit anti-γ-H2AX grün gefärbten Zellen mittels FITC-Filter aufgenommen. Die Unterscheidung in G1-, S- und G2-Phase erfolgte über den DAPI-Gehalt der Zellen, G1-Phase-Zellen weisen nur einen einfachen, G2-Phase-Zellen einen doppelten DNA-Gehalt auf. Die Unterscheidung der S-Phase-Zellen erfolgte anhand des intensiven γ-H2AX-Signals der Zellen durch Aphidicolin-Zugabe. Hier wurde die Intensität des Foci-Signals bestimmt, um eine Aussage über die Anzahl der Doppelstrangbrüche in UVC- und mit IR behandelten Proben treffen zu können.

3.12 Methoden zur Untersuchung des G1/S-Übergangs

3.12.1 Serumentzug als Methode zur Bestimmung des G1/S-Übergangs

Durch Verringerung des Serumanteils im Zellkultur-Medium erreicht man eine Synchronisation der Zellen, da diese durch den Mangel an Nährstoffen nicht mehr weiter zyklieren, sondern sich vermehrt in der G₀-Phase, also der Ruhephase des Zellzyklus, sammeln. Wird der Serumgehalt erhöht, treten die Zellen wieder aktiv in den Zellzyklus ein und laufen, größtenteils geschlossen, weiter in die nächste Zellzyklusphase, hier von der G₁- in die S-Phase, was zu deutlicheren Effekten bei der Messung des G₁/S-Checkpoints führt, da S-Phase-Effekte größtenteils ausgeschlossen werden können.

Nach 4 bis 5 tägiger Kultivierung im Mangelmedium wurden die Zellen durch Zugabe von Vollmedium mit 20 % FCS stimuliert, gleichzeitig wurde zur Markierung der S-Phase 1 µM EdU und je nach Versuchsansatz zur Inhibierung von ATM ein ATM-Inhibitor (10 µM) zugegeben. 30 min nach Stimulation der Zellen erfolgte, wie unter 3.10.7.2 beschrieben, die Bestrahlung mit 6 J/m² und 12 J/m². Nach Ablauf der Reparaturzeit von 15 min wurden die Zellen, wie unter 3.12.2.4 beschrieben, fixiert und gefärbt, weitere Erntezeitpunkte folgten nach 10 h, 12 h, 15 h, 18 h und 24 h. Da sich über den gesamten Versuchszeitraum EdU im Medium befand, akkumulierten über den Versuchszeitraum von 24 h EdU-positive Zellen. Diese Zellen befanden sich zu einer bestimmten Zeit im Laufe des Experiments in der S-Phase.

Auswertung der EdU-positiven Zellen:

Die fixierten und gefärbten Zellen wurden mit 400-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop ausgezählt. Dabei wurde der Anteil der EdU-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl (DAPI-gefärbte Zellen) bestimmt. Insgesamt wurden pro Bedingung und Zeitpunkt 1000 Zellen bewertet.

3.12.2 BrdU/EdU-Doppelmarkierung als Methode zur Untersuchung des G1/S-Übergangs

3.12.2.1 BrdU-Markierung von Zellen

BrdU ist ein Analogon des Nukleosids Thymidin und wird bei proliferierenden Zellen anstatt Thymidin während der Replikation in der S-Phase eingebaut. Zur Markierung proliferierender Zellen wurde 10 µM 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) in das Medium gegeben. Über eine Antikörperfärbung können das in der DNA vorhandene BrdU sichtbar gemacht und S-Phase-Zellen identifiziert werden. Bei einer Pulsmarkierung verblieb das BrdU 15 min bis 30 min auf den Zellen, bevor es mit PBS oder vorgewärmtem Medium von den Zellen gewaschen wurde. Bei durchflusszytometrischen Analysen betrug die Markierungszeit 1 h.

3.12.2.2 EdU-Markierung von Zellen

Wahlweise wurde zur Detektion der DNA-Synthese in proliferierenden Zellen auch EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) des click-iT™ Kits von Invitrogen eingesetzt. EdU ist, wie auch BrdU, ein Nucleosid-Analogon zu Thymidin und wird während der DNA-Synthese anstatt des Thymidins in die DNA eingebaut. Ein Vorteil der EdU-Markierung gegenüber der BrdU-Markierung ist die schonendere Fixierung und Permeabilisierung der Zellen, da die Moleküle zur Detektion des EdU relativ klein sind und so leichteren Zugang zur DNA haben. Die Detektion ist sehr sensitiv und kann in kurzer Zeit durchgeführt werden, indem ein fluoreszierendes Azid, hier Alexa Fluor®594, über eine Cu(I)-katalysierte [3+2] Cycloadditions-Reaktion („click“-Reaktion, Salic und Mitchison, 2008) nachgewiesen wird. Bei einer Pulsmarkierung wurde das EdU in einer Konzentration von 1 µM 15 min bis 30 min zu den Zellen gegeben und anschließend durch 2-maliges Waschen mit PBS oder warmem Medium entfernt.

3.12.2.3 Doppelmarkierung mit BrdU und EdU

Eine einfache und sensitive Methode, die Aufhebung des G1/S-Checkpoints in Zellen zu untersuchen, ist die Doppelmarkierung der S-Phase-Zellen mit EdU und BrdU. Zwei Tage vor Beginn des Versuchs wurden $2,5 \times 10^5$ 82-6hTert-Zellen in mittleren Zellkulturschalen mit je 12 Deckgläschen ausgesät. Am Versuchstag wurde die Zellkultur 30 min mit EdU (1 µM) markiert, um zunächst alle Zellen, die sich zu diesem Moment in der S-Phase befanden, zu identifizieren. Vor Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen zwischen 0,2 Gy und 1 Gy wurden die Zellen 2 Mal mit warmem Medium gewaschen, um nicht eingebautes EdU zu entfernen, bevor 5 ml frisches Medium zugegeben wurden. Nach Bestrahlung erfolgte die Markierung mit BrdU (20 µM, 20 µl/ml). Die zusätzliche Zugabe von Nocodazol (40 µl, 80 ng/ml) hält die Zellen in der Mitose, um Zellen des folgenden Zellzyklus aus der Auswertung auszuschließen. Die Zellen im BrdU-haltigen Medium wurden bis zum Zeitpunkt der Fixierung (0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h und 10 h) im Brutschrank inkubiert.

3.12.2.4 Fixierung und Färbung von BrdU und EdU

Die Fixierung der Zellen erfolgte angelehnt an das Fixierungsprotokoll des Click-iT™EdU Fluor® 594 Imaging Kits (Invitrogen).

Die Zellen wurden für 10 min bei Raumtemperatur mit 3,7 % Formaldehyd in PBS fixiert, anschließend erfolgte ein Blockierungsschritt von 2 Mal 10 min mit 3 % BSA in PBS, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden die Deckgläschen 20 min bei Raumtemperatur in eine Lösung von 0,1% TritonX-100 in PBS gelegt. Anschließend wurde der Blockierungsschritt (2 Mal 10 min 3% BSA in PBS) wiederholt. Zur weiteren Permeabilisierung wurden die Deckgläschen 5 min in - 20°C kaltem Methanol gehalten und anschließend der Blockierungsschritt von 2 Mal 10 min mit 3 % BSA in PBS wiederholt. Hier konnten die Zellen bis zur Färbung bei 4°C gelagert werden.

Vor der Färbung wurden die fixierten Zellen 2 Mal 10 min mit PBS gewaschen und anschließend 30 min bei Raumtemperatur mit 80 µl Image-iT™ FX Signal Enhancer in einer feuchten Kammer

überschichtet und danach 10 min mit PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation der Zellen mit 80 µl Click-iT™ Reaktionscocktail (siehe 3.2.2) für 30 min bei Raumtemperatur. Vor Zugabe des primären Antikörpers anti-BrdU (mouse, monoclonal) wurde 3 Mal 5 min mit 3 % BSA in PBS gewaschen. Der primäre Antikörper zur Detektion von BrdU wurde 1:50 in Inkubationspuffer (siehe 3.2.2) mit 5 µg/ml DNase verdünnt. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde 3 Mal 5 min mit 3 % BSA in PBS gewaschen und der sekundäre Antikörper Alexa Fluor®488 goat-anti-mouse in der Verdünnung 1:500 in PBS/1 % FCS auf die Deckgläschen gegeben. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde 3 Mal 10 min mit PBS gewaschen, anschließend erfolgte die DAPI-Färbung der Zellkerne und das Versiegeln der Deckgläschen (siehe 3.11.2.1).

Auswertung der BrdU/EdU-markierten Zellen:

Die Auswertung erfolgte nur in den EdU-negativen und BrdU-positiven Zellen, also Zellen, die nach Bestrahlung in die S-Phase gelaufen waren. Zur Unterscheidung der G1- und G2-Phase aufgrund des unterschiedlichen DNA-Gehalts und zur Ermittlung der Gesamtzellzahl wurden die Zellen mittels DAPI-Filter, die EdU-positiven Zellen mit dem Texas Red- und die BrdU-positiven Zellen mit dem GFP-Filter, wie unter 3.11.2.2 beschrieben, abgescannt. Anschließend wurden EdU-positive Zellen ausgeschlossen und der Anteil der BrdU-positiven, EdU-negativen Zellen an der Gesamtzellzahl zu den unterschiedlichen Zeitpunkten gezählt.

3.12.2.5 Doppelmarkierung BrdU und EdU mit γ -H2AX

Zur Untersuchung der Aufhebung des G1-Checkpoints mit gleichzeitiger Bewertung des DNA-Schadenslevels wurden 82-6hTert-Zellen dreifach gefärbt. Die Markierung mit EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) des click-iT™ Kits von Invitrogen diente wieder zur generellen Identifikation von S-Phase-Zellen während der Bestrahlung. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Dosen bestrahlt, und eine anschließende Markierung mit BrdU 2 h vor Fixierung der Zellen und Färbung gegen BrdU zeigte S-Phase-Zellen an, die in der Zeit der BrdU-Markierung in die S-Phase gelaufen waren. Das Schadenslevel dieser Zellen wurde über die Färbung mit anti- γ -H2AX (Ser 139, rabbit, polyclonal) festgestellt.

Zwei Tage vor Beginn des Versuchs wurden $2,5 \times 10^5$ 82-6hTert-Zellen in mittleren Zellkulturschalen mit je 12 Deckgläschen ausgesät. Am Versuchstag wurden die Zellen 30 min vor Bestrahlung mit 1 µM EdU markiert und zur Reparatur in den Brutschrank gestellt. Die Markierung der Zellen mit 20 µM BrdU erfolgte zwei Stunden vor deren Fixierung. Vor der Markierung wurden die Zellen 2 Mal mit warmem Medium zur Entfernung des nicht eingebauten EdU gewaschen.

3.12.2.6 Fixierung und Färbung von BrdU und EdU mit γ -H2AX

Die Fixierung der Zellen erfolgte angelehnt an das Fixierungsprotokoll des Click-iT™EdU Fluor® 594 Imaging Kits (Invitrogen).

Die Zugabe von 20 µl des primären Antikörpers anti- γ -H2AX (Ser 139), rabbit, polyclonal (1:1500 in PBS-3% BSA), erfolgte direkt nach der Fixierung der Zellen über Nacht bei 4°C.

Am folgenden Tag wurde BrdU/EdU gefärbt, siehe 3.12.2.4. Als sekundäre Antikörper bei dieser Färbung wurden Alexa Fluor®488 goat-anti-rabbit in der Verdünnung 1:500 in PBS/1 % FCS und Alexa Fluor®647 goat-anti-mouse in der Verdünnung 1:200 in PBS/1 % FCS eingesetzt.

Auswertung der BrdU- und EdU-markierten Zellen mit γ -H2AX:

Ausgewertet wurde die Anzahl der γ -H2AX-Foci in den Zellen der G1-Phase und den EdU-negativen und BrdU-positiven Zellen der S-Phase, also in denjenigen Zellen, die zu den jeweiligen Zeitpunkten in den letzten 2 h vor Fixierung in die S-Phase gelaufen waren. Hierzu wurde wiederum die Software Metafer der Firma MetaSystems verwendet, das Vorgehen entsprach der Auswertung des Doppelmarkierungsansatzes (siehe Kapitel 3.12.2.4) ohne γ -H2AX-Färbung. Aufgenommen wurden die Zellen mit dem DAPI-Filter, um zwischen G1-Phase-Zellen mit einfachem DNA-Gehalt und G2-Phase-Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt unterscheiden zu können. Ebenfalls wurden die EdU-positiven Zellen mit TexasRed-Filter, die BrdU-positiven Zellen mit Cy5-Filter abgescannt, um die γ -H2AX-Foci nach Aufnahme der Zellen mit dem GFP-Filter im Mikroskop mit dem Auge zählen zu können. Die Fluoreszenz der Zellen, welche mit Alexa Fluor®647 gefärbt und über einen Cy5-Filter aufgenommen wurden, ließen sich nur über die Kamera, nicht aber über das menschliche Auge detektieren.

3.12.3 Untersuchungen mittels Durchflusszytometer

Zur Bestimmung der Verteilung von Zellen einer Zellpopulation innerhalb des Zellzyklus wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Die Analyse beruht auf der Messung des DNA-Gehaltes und den physikalischen Eigenschaften auf Einzelzelebene in einer Zellsuspension. Über verschiedene Farbstoffe, mit denen die Zellen gefärbt werden, können Subpopulationen der zu messenden Probe dargestellt werden. Hierzu müssen sich die Emissionen der Fluorochrome so weit unterscheiden, dass ihre Maxima klar getrennt über unterschiedliche Detektoren (*Photo Multiplier*) gemessen werden können. Angeregt werden die Farbstoffe über einen Argon-Laser mit der Wellenlänge 488 nm. Während die Zelle in einem Flüssigkeitsstrom den Laser passiert, wird detektiert, wie die Zelle das Licht des Lasers streut und Fluoreszenz emittiert. Daraus ergeben sich Informationen über Zellgröße, gemessen über den *Forward Light Scatter* (FSC), Granularität, gemessen über den *Side Scatter* (SSC) und relative Intensität der Fluoreszenz. Der DNA-Gehalt einer Zelle wird über eine Färbung mit Propidiumiodid ermittelt. Der Fluoreszenzfarbstoff interkaliert zwischen den Basenpaaren der doppelsträngigen DNA. Die Absorptionsmaxima liegen bei 350 und 365 nm. Durch die Messung der Fluoreszenz-Intensität kann der DNA-Gehalt der Zellen bestimmt werden, diploide Zellen besitzen in der G0/G1-Phase einen DNA-Gehalt von $2n$, der in der S-Phase ansteigt und in der G2/M-Phase einen Gehalt von $4n$ erreicht. Bei der Auswertung mit der Software Cell Quest/CXP Analysis können so die Peaks im Histogramm der G1-Phase (Zellen mit einfachem DNA-Gehalt), der G2-Phase (Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt) und der S-Phase (intermediärer DNA-Gehalt) zugeordnet werden. Durch die Puls-Markierung der Zellen mit BrdU und deren Färbung mit einem FITC (Fluoreszeinisothiocyanat)-gekoppelten BrdU-Antikörper (BD) lassen sich Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Markierung in der S-Phase befanden und während der Replikation Thymidin durch BrdU

ersetzen, als gesonderte, BrdU-positive Population erkennen. Der Anregungsbereich von FITC (Grün) liegt bei 468-509 nm, die Emission bei 504-541 nm. Diese Population läuft oberhalb der G1- und G2-Phase. Die BrdU-Färbung ermöglicht es außerdem, jene S-Phase-Zellen zu identifizieren, die erst nach der Bestrahlung in die S-Phase eingetreten sind. Diese Zellpopulation ist BrdU-negativ und im *DotPlot* zwischen G1- und G2-Phase zu finden. Über die Software Cell Quest/CXP Analysis wird ihr Anteil an der gesamten Zellpopulation quantifiziert. BrdU-positive Zellen, also Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befinden, können ausgeschlossen werden. Die Messung der Zelleigenschaften mit dieser Methode beruht auf einer hohen Empfindlichkeit, sie ist schnell und wegen der großen Anzahl an gemessenen Zellen sehr aussagekräftig.

3.12.3.1 BrdU-Markierung und Fixierung der Zellen für die Durchflusszytometrie

Eine exponentiell wachsende Zellkultur wurde für 1 h mit 10 µM BrdU inkubiert. Zur Entfernung des nicht eingebauten BrdU wurden die Zellen 2 Mal mit warmem PBS gewaschen und frisches, warmes Medium ohne BrdU, aber mit 1 µg/ml Nocodazol zur Arretierung der Zellen in der Mitose, zugegeben. Anschließend wurden die Zellen bestrahlt und bis zum Ablauf der Reparaturzeit in den Brutschrank gestellt. Danach wurde das Medium aus den Zellkulturgefäßen abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin-EDTA vom Gefäßboden gelöst. Die Zellen wurden in kaltem Medium aufgenommen, bei 300xg und 4°C für 10 min abzentrifugiert und danach mit 2 ml kaltem PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch die tropfenweise Zugabe von 2 ml 70 % Ethanol (- 20°C) unter ständigem Vortexen. Die Aufbewahrung der fixierten Proben erfolgte bis zur Färbung bei - 20°C.

3.12.3.2 Färbung der Zellen für die Durchflusszytometrie

Zur Färbung wurden die fixierten Zellen bei 300xg und 4°C für 10 min pelletiert, das Pellet mit 2 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Zur Denaturierung der DNA wurde 1 ml 2 M HCl für 20 min (RT) zu den Zellen gegeben und nach Ablauf dieser Zeit mit 1 ml PBS/1 % FCS neutralisiert. Nach erneuter Zentrifugation (300xg, 4°C, 10 min) wurde das Pellet in 500 µl 0,1 M Natrium-Tetraborat (pH 8,5) resuspendiert und 2 min bis 4 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde wieder 1 ml PBS/1 % FCS zugegeben und zentrifugiert (300xg, 4°C, 10 min). Die Färbung des BrdU erfolgte durch Zugabe von 20 µl einer FITC-konjugierten anti-BrdU-Antikörper-Lösung (BD) 30 min bei RT und Dunkelheit. Die Zellen wurden nach Zugabe von 1 ml PBS/1 % FCS zentrifugiert (300xg, 4°C, 10 min), das Pellet anschließend in 0,5 ml bis 1 ml Propidiumiodid-Gebrauchslösung (0,1 mg/ml in PBS) zur Färbung der DNA aufgenommen und 30 min bei RT und im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben bis zur Messung im Durchflusszytometer kühl und dunkel gehalten.

3.12.3.3 Messung und Auswertung der Zellen

Während der Messung für die Analyse des G1/S-Checkpoints wurden 15000-20000 Zellen im Durchflusszytometer gezählt und ausgewertet. Die Auswertung wurde mit der Software Cell Quest bei dem Durchflusszytometer FACS Scan™ (Becton Dickinson) und der Software CXP Analysis beim

Durchflusszytometer FC500 (Beckman Coulter) durchgeführt. Durch das Setzen von *Gates* wurden die einzelnen Populationen, hier G1-Phase, G2-Phase, BrdU-negative S-Phase und BrdU-positive S-Phase, quantifiziert und das Fortschreiten der Zellen im Zellzyklus zu den unterschiedlichen Zeitpunkten miteinander verglichen.

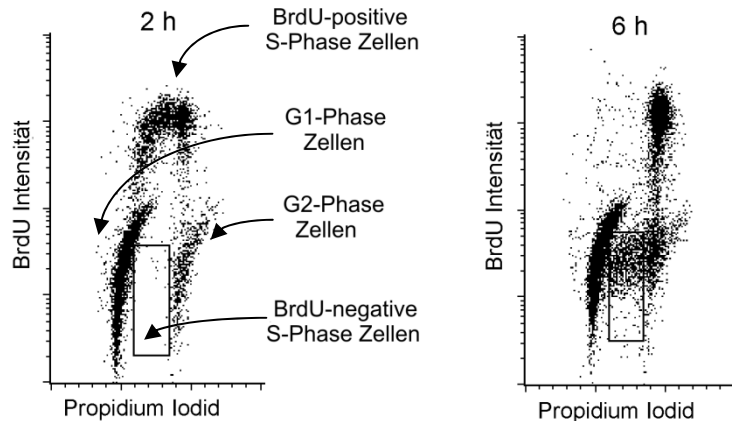


Abb. 14: Auswertung von DotPlots im Durchflusszytometer

Die *DotPlots* stellen exemplarisch die Population von fixierten 82-6hTert-Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten dar, hier nach 2 h und 6 h, wobei jeder Punkt einer fixierten Zelle entspricht. Der DNA-Gehalt der Zellen ist auf der Abszisse linear aufgetragen, G1-Zellen besitzen einen einfachen DNA-Gehalt ($2n$), G2-Zellen einen doppelten DNA-Gehalt ($4n$). Die Ordinate zeigt in logarithmischer Skalierung die BrdU-Intensität der Zellen. Je höher die Zellen im Diagramm liegen, desto höher ist ihr Gehalt an eingebautem BrdU. Das eingezeichnete Rechteck in den *DotPlots* zeigt die Population BrdU-negativer S-Phase-Zellen an. Die Population über dem Rechteck gibt BrdU-positive Zellen an, die von der G1-Phase über die S-Phase zur G2-Phase laufen.

3.12.4 Live Cell Imaging

Die Analyse lebender Zellen basiert auf dem MetaSystems Scanning System, welches aus der MetaSystems Software Metafer4, einem motorisierten Scanning-Tisch (Märzhäuser) und einer *Charge-Coupled-Device* (CCD)-Kamera (CV-M4+CL, JAI) besteht. Mit Hilfe des Scanning-Tisches von Märzhäuser ist es möglich, Positionen auf einem Slide reproduzierbar anzufahren, was vor allem nach Fixierung und anschließender Färbung von Zellen von Vorteil ist. Dieses System wurde zusammen mit dem inversen Axiovert 200M-Mikroskop von Zeiss verwendet. Die transfizierten 82-6hTert-Zellen wurden in MEM-Medium in ein μ -slide VI (ibidi) ausgesät und bei 5 % CO_2 und 37°C anwachsen gelassen. Um die Verdunstung des Mediums zu vermeiden, wurden die Reservoirs der μ -slide VI-Kanäle mit Silikon-Öl überschichtet. Am Tag der Aufnahme wurde das μ -slide VI in den Scanning-Tisch des Mikroskops eingelegt. Das System innerhalb der Klima-Kammer (Incubator XL-3) war auf 37°C erwärmt und ein steter CO_2 -Strom von 5% gewährleistet. Geregelt wurden diese Parameter über eine Temperatur-Einheit und einen CO_2 -Controller (Pecan GmbH). Die jeweiligen Positionen der Aufnahme wurden über die Software festgelegt, ebenso die Belichtung bei Aufnahme der Durchlicht- und Auflicht-Bilder. Bei der Durchlicht-Aufnahme wurde ein Autofokus eingestellt, anschließend wurden Auflicht-Bilder über TexasRed- und GFP-Filter in einem Intervall von 30 min bis zu 1 h aufgenommen.

3.12.4.1 GFP-53BP1 und RFP-Ligasel

Zur Detektion von Doppelstrangbrüchen (DSBs) wurde der Reparaturfaktor 53BP1 verwendet. Für die Anwendung im LCI war die Sequenz von 53BP1 aus der Maus in den Vektor pEGFP-C1 (clontech) fusioniert worden (Bekker-Jensen *et al.*, 2005). Dieses Konstrukt wurde uns freundlicherweise von Claudia Lukas zur Verfügung gestellt.

Die Identifizierung der S-Phase in lebenden Zellen fand über das Konstrukt RFP-Ligasel statt. In den Vektor pDsRed1-C1 wurde die Sequenz der humanen DNA-Ligasel kloniert (Easwaran *et al.*, 2005). Das Konstrukt wurde freundlicherweise von M. Cristina Cardoso zur Verfügung gestellt.

3.12.4.2 Aufnahme der Zellen

Zur Aufnahme der Zellen mittels *Live Cell Imaging*-System wurde das μ -slide VI mit den ausgesäten Zellen in eine der vier Positionen des Scanning-Tischs SCAN IM 130 x 100 (Märzhäuser) des Mikroskops Axiovert 200M (Zeiss) eingespannt. Die restlichen drei Positionen des Scanning-Tisches wurden mit Plastikabdeckungen versehen. Die über das Mikroskop gesetzte *Live Cell*-Kammer (Pecon) war auf 37°C vorgewärmt. Um eine gute Gasversorgung mit 5 % CO₂ gewährleisten zu können, wurde eine CO₂-Kammer angefertigt, welche man direkt auf den Scanning-Tisch setzen und so über den Proben platzieren konnte. Die komplette Abdeckung des Tisches verhinderte ein zu schnelles Absinken des CO₂.

Die Aufnahme der mit GFP-53BP1 und RFP-Ligasel transfizierten bzw. untransfizierten Zellen bei der Bestimmung des Mitotischen Index erfolgte über Positionslisten, welche vor der Aufnahme festgelegt werden konnten. Die Positionen wurden dann in regelmäßigen Abständen je nach Fragestellung zwischen 15 min und 60 min angefahren, und eine Aufnahme der Zellen dieser Position angefertigt. Hierfür wurde vor jeder Aufnahme eine Durchlichtaufnahme (30-50 ms) zur Einstellung des Focus vorgenommen, es folgten die Aufnahmen mit Auflicht (Anregung RFP-Ligasel-transfizierter U2OS-Zellen über TxR-Filter 700ms, Anregung RFP-Ligasel- und GFP-53BP1-transfizierter 82-6hTert-Zellen über TxR-Filter 350 ms, GFP53BP1-Filter 350 ms). Zur quantitativen Auswertung des RFP-Ligasel-Signals wurde eine Ebene, zur Auswertung und Zählung der GFP-53BP1-Foci wurden 3 Ebenen im Abstand von 900 μ m aufgenommen.

3.12.4.3 Auswertung des G1/S-Phase-Übergangs

Von den aufgenommenen Bildabfolgen wurden sowohl die Durchlicht- als auch die Auflichtbilder mittels der Software ACDsee analysiert. Hierbei wurden zunächst die über TexasRed-Filter aufgenommenen Bilder nach Zellen durchsucht, die zum einen eine Expression des transfizierten Konstrukts RFP-Ligasel zeigten und die man zum Anderen beim Übergang von G1 nach S beobachten konnte. Der Übergang wurde durch eine Änderung des RFP-Ligasel-Musters deutlich. Während der G1-Phase war das Signal flächig, bei Eintritt in die S-Phase zeigte sich über den ganzen Zellkern verteilt ein feines Punktmuster, welches die in der S-Phase entstehenden Replikationsfoci demonstriert. Diese Zellen wurden so weit wie möglich durch den gesamten Film verfolgt und dabei die Dauer der aufeinanderfolgenden Zellzyklus-Phasen notiert. Um die Anzahl der GFP-53BP1-Foci in

jeder Stunde feststellen zu können, wurden die Bilder der im GFP-Kanal aufgenommenen Zellen analysiert und die Foci der Zellen gezählt.

3.12.4.4 Bestimmung des Mitotischen Index

Um beurteilen zu können, ob Zellen normal wachsen, oder ob sie durch äußere Einflüsse geschädigt wurden, wurde der Mitotische Index bestimmt. Der Mitotische Index gibt die Anzahl der Mitosen einer Zellkultur pro Stunde an. Werden die Zellen z.B. durch Röntgenstrahlung und die dadurch entstehenden Doppelstrangbrüche (DSBs) geschädigt, setzt der G2/M-Checkpoint ein, der MI sinkt ab. Haben die Zellen die DSBs wieder repariert, wird der Checkpoint aufgehoben, der MI steigt an. Die Zellen wurden hierzu in μ -slides VI der Firma ibidi ausgesät und mit Hilfe des *Live Cell Imaging*-Systems im Durchlicht aufgenommen und die mitotischen Zellen ausgewertet. Hierzu wurden die sich teilenden Zellen als Anteil der Gesamtzellzahl eines Bildes gezählt. Wurden die Zellen in 30-minütigem Abstand aufgenommen, wurde die Anzahl der jeweils ausgezählten Zellen von zwei Bildern zusammengefaßt, um den MI pro Stunde zu erhalten.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des G1/S-Checkpoints in der lebenden Zelle

Die Proliferation von Zellen mit Doppelstrangbrüchen (DSBs) kann zu genomischer Instabilität, Mutationen und dadurch zur Krebsentstehung führen. Die Zelle benötigt daher Zeit, ihre Mechanismen zur Reparatur der DNA zu aktivieren und die Schäden zu beseitigen. Diese Zeit wird ihr von Kontrollpunkten, den Checkpoints (Hartwell und Weinert, 1989), zur Verfügung gestellt, die wichtige Übergänge im Zellzyklus regulieren. Die Checkpoints können über DNA-Schäden aktiviert werden, wodurch die Zellzyklus-Progression gehemmt wird. Die Wichtigkeit des G1/S-Checkpoints ist daran erkennbar, dass er in entarteten Zellen dereguliert ist und die Zellen in den meisten Fällen keinen G1/S-Checkpoint mehr aufweisen (Kastan, 1991). Der G1/S-Checkpoint gilt im Zellzyklus als „Master-Checkpoint“, der die genomische Stabilität der Zelle aufrecht erhält (Huang *et al.*, 1996, Wahl *et al.*, 1997, Löbrich und Jeggo, 2007). Er ist biochemisch gut charakterisiert (Carnero und Hannon, 1998, Hengst und Reed, 1998, Sherr und Roberts, 1999, Santamaria und Ortega, 2006), allerdings ist weniger über seine Regulation auf zellulärer Ebene bekannt. Ein Ziel dieser Arbeit ist die genauere Charakterisierung des G1/S-Checkpoints in Bezug auf den zeitlichen Ablauf seiner Aktivierung und die Aufrechterhaltung nach der Induktion von DSBs durch ionisierende Strahlung (IR). Weiterhin soll seine Sensitivität untersucht werden, d.h. mit wie vielen unreparierten DSBs der Arrest des Zellzyklus überwunden und auch wieder aufgehoben wird. Diese Fragen wurden zunächst mit der neu etablierten Methode des *Live Cell Imaging* (LCI) bearbeitet. Im Anschluss erfolgte die Verifizierung der Ergebnisse des LCI mit klassischen Methoden wie Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz-Mikroskopie.

4.1.1 Das *Live Cell Imaging*-System: Versuche in der lebenden Zelle

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zur Charakterisierung des G1/S-Checkpoints die Methode des LCI etabliert werden. Mit diesem Verfahren ist es möglich, einzelne Zellen lückenlos über mehrere Stunden bis Tage zu verfolgen. In regelmäßigen Intervallen werden Bilder der Zellen an festgelegten Positionen aufgenommen und zu Filmen zusammengesetzt, die schließlich ausgewertet werden können. Weiterhin ermöglicht die Transfektion der Zellen mit Plasmiden, bei denen ein zu untersuchendes Zielprotein mit einem Fluorochrom gekoppelt ist, die Untersuchung des Verhaltens dieser Proteine. Das Protein kann so über Anregung mit Auflicht sichtbar gemacht und z.B. nach unterschiedlichen Behandlungen der Zellen im LCI-System beobachtet werden. Durch die Methode des LCI ergibt sich somit die Möglichkeit der Analyse von dynamischen, zellulären Prozessen an lebenden Zellen.

4.1.1.1 Aufbau eines LCI-Systems

Da es sich in Versuchen mit dem LCI-System stets um lebende Zellen handelt, die auch während des Versuchs optimal versorgt sein müssen, ist die genaue Überwachung der Umgebungsbedingungen bei der Anwendung dieser Methode ein kritischer Faktor. Daher mussten zunächst die Inkubationsbedingungen für die mikroskopischen Aufnahmen optimiert werden. Die Etablierung der Technik und die dazu notwendigen Kontrollexperimente wurden gemeinsam mit Dipl.-Biol. Eik Schumann durchgeführt.

Um die Temperatur konstant zu halten, wurde ein geschlossener Inkubator der Firma Pecon (Inkubator XL-3) auf das inverse Mikroskop Axiovert 200M (Zeiss) gesetzt (Abb. 15). Mittels einer Heizeinheit wurde das Innere dieser Kammer auf 37°C erwärmt und die Temperatur geregelt.

Zur optimalen CO₂-Versorgung der Zellen über eine CO₂-Einheit wurde zusätzlich eine kleine CO₂-Kammer angefertigt, welche passgenau auf den Objektträger-Tisch aufgesetzt werden konnte. Das auf die Zellen strömende CO₂ wurde außerdem durch eine Waschflasche mit sterilem Wasser geleitet und angefeuchtet, um ein Austrocknen der Zellen bzw. die Abnahme des Mediums in den Aussaat-Gefäßen zu verhindern.

Bei der Wahl der Aussaatgefäße wurde darauf geachtet, dass sie über eine optische, dünne Oberfläche zur optimalen Aufnahme der Bilder verfügen. Weiterhin sollten Gas- und Wärmeaustausch gewährleistet und die Zellen in diesen Gefäßen zu fixieren sein. Die beste Lösung stellten in diesem Fall Aussaatgefäße der Firma ibidi, das μ -slide VI, dar. Weil das Volumen der μ -slides VI relativ gering ist, wurde als zusätzlicher Schutz gegen Austrocknung ein Tropfen Silikonöl auf die Oberfläche des Mediums aufgebracht.

Da die Aussaatgefäße für die Zellen zur Verbesserung der optischen Eigenschaften sehr dünnwandig sind, unterlagen die Zellen schnell Temperaturschwankungen, sobald sie aus dem Inkubator genommen wurden. Da sie jedoch zur Bestrahlung an die Röntgenröhre gebracht wurden und während der Bestrahlung in ihr verbleiben mussten, wurde eine Styroporbox mit einer Bleimaske angefertigt, die stets auf 37°C temperiert war. Auf dieser Bleimaske mit entsprechenden Aussparungen konnten die Aussaatgefäße fixiert und in der Box bestrahlt werden, ohne zu schnell auszukühlen.

Eine zu starke Belichtung der Zellen kann über längere Zeiträume bei der Aufnahme zu Schädigungen z.B. an der DNA führen. Um Schäden der Zellen bei Durchlicht (DL)- und Auflicht (AL)-Aufnahmen über GFP- und TexasRed (TxR)-Filter weitgehend zu vermeiden, erwiesen sich kurze Belichtungszeiten (DL ~ 30 ms bis 50 ms, GFP-Filter ~ 150 ms bis 600 ms und TxR-Filter ~ 300 ms bis 700 ms) mit einem Kamera-Gain von 4 als optimal. Zusätzlich wurde ein 6 %- bzw. 25 %-Neutralfilter inklusive UV-Filter vor die HBO 100-Lampe gesetzt. Die automatische Einstellung des Focus wurde standardmäßig im Durchlicht ausgeführt. Für die Aufnahme des RFP-Ligasel-Musters der Zellen wurde grundsätzlich eine Bildebene eingestellt. Zur Aufnahme der GFP-53BP1-Foci in den Zellen wurden zur besseren Detektion 3 Ebenen im Abstand von 900 μ m gewählt. Die zeitlichen Abstände zwischen den Aufnahmezyklen lagen je nach Versuch zwischen 15 min bis zu 1 h. So konnten je nach Zeitabstand und Anzahl der eingesetzten Filter zwischen den Zyklen 400 bis 600 Positionen abgescannt werden. Die Aufnahmedauer während eines Experiments lag je nach Fragestellung zwi-

schen 12 h und 24 h. Für die Aufnahmen wurde eine *Charge-Coupled-Device* (CCD)-Kamera (CV-M4+CL) von JAI verwendet.

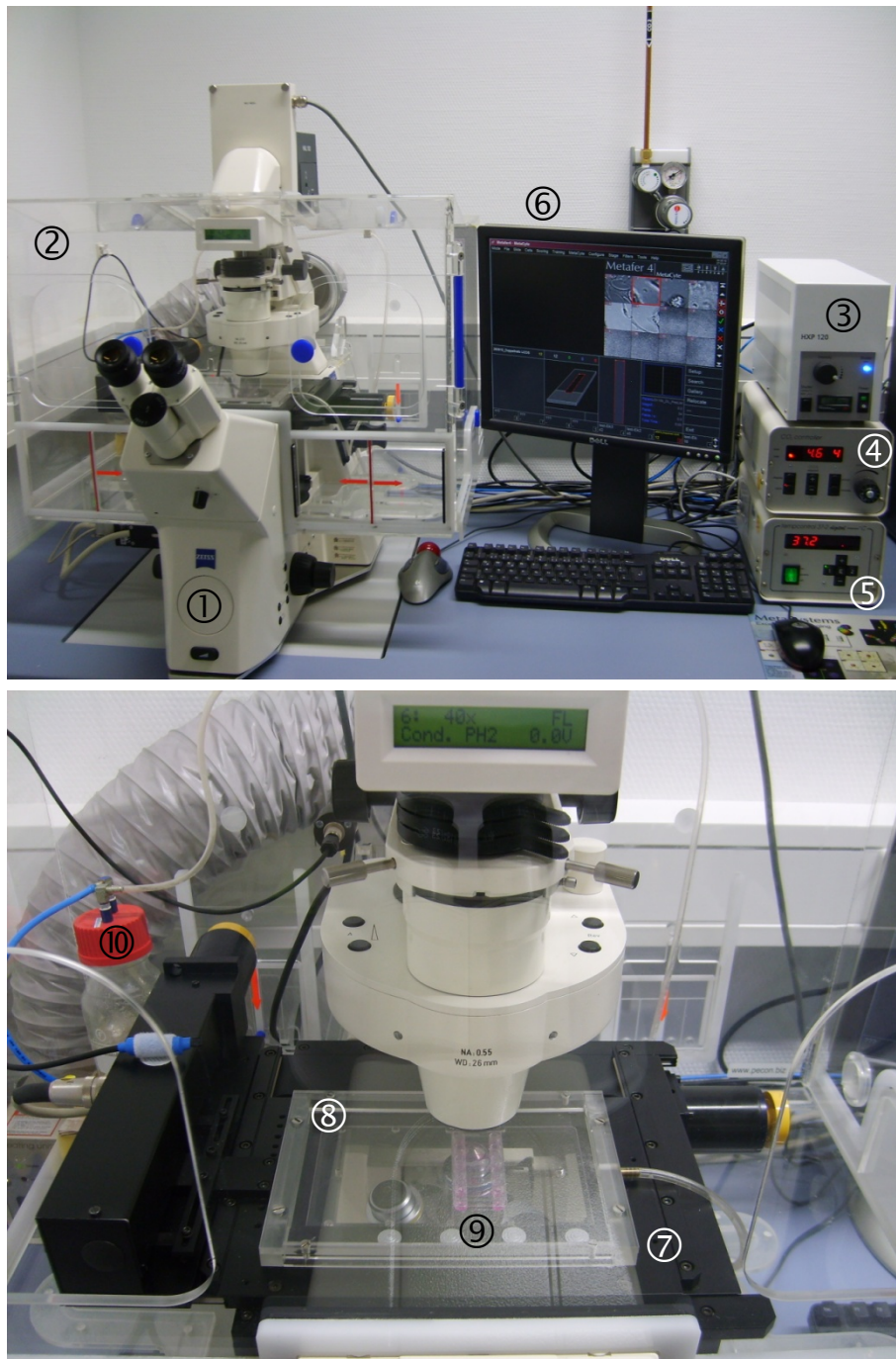


Abb. 15: Komponenten des Live Cell Imaging-Systems

- | | |
|-------------------------------|---|
| ① Mikroskop Axiovert 200M | ⑥ Steuer-Rechner mit Programm Metafer |
| ② Inkubator XL | ⑦ Scanning-Tisch |
| ③ Lampe HXP 120 | ⑧ zusätzl. CO ₂ -Kammer, darunter Plastikabdeckungen |
| ④ CO ₂ -controller | ⑨ µ-slide VI |
| ⑤ tempcontrol 37-2 digital | ⑩ Waschflasche |

Um das inverse Mikroskop Axiovert 200M von Zeiss zu einem LCI-System auszubauen, wurde der Inkubator XL der Firma Pecon auf das Stativ des Mikroskops gesetzt. Da er vom Lampengehäuse bis zum Ansatz der Okulare reicht, wurde kein zusätzliches Heizelement für die Objektive benötigt. Er ermöglicht durch sein großes Volumen die Inkubation bei relativ

stabilen Temperatur-Bedingungen. Zur CO₂-Begasung der Proben wurde eine zusätzliche CO₂-Kammer angefertigt, die passgenau auf den Objektträger-Halter des Scanning-Tisches (Märzhäuser) aufgesetzt wird. Um zu verhindern, dass das CO₂ zu schnell durch den nach unten offenen Scanning-Tisch absinkt, wurden die freien Objektträger-Plätze neben der Probe mit Plastikabdeckungen verschlossen. Zum Einsetzen oder zur Entnahme der Proben aus dem Inkubator sind an der Vorderseite des Inkubators jeweils zwei kleinere Schiebetüren und zwei etwas größere Scharnirtüren angebracht.

Zur Regulation der Temperatur wird die elektrische Einheit *tempcontrol 37-2 digital* (Pecon) verwendet. Die aktuelle, gemessene Temperatur wird auf dem Display angezeigt, gleichzeitig wird über eine Regeleinrichtung die Temperatur konstant gehalten. Die Heizeinheit *tempcontrol 37-2* (Pecon) erwärmt das Innere des Inkubators über einen Zuleitungsschlauch, ein eingebauter, auswechselbarer Filter minimiert die Staubbelastung im Innern des Systems.

Die Einstellung der Konzentration des Luft/CO₂-Gemisches ist über eine Einheit zur CO₂-Kontrolle (Pecon) möglich. Hier wird in einer Mischkammer Luft und CO₂ auf eine Konzentration von 5 % CO₂ eingestellt. Ein Lüfter verteilt das Gemisch gleichmäßig im Inkubator. Ein Sensor registriert die aktuelle CO₂-Konzentration, und über eine Regeleinrichtung wird die Menge an CO₂, welche in die Mischkammer gelangt, gesteuert.

Um die CO₂-haltige Luft anzufeuchten und so ein vorzeitiges Eintrocknen der begasten Proben zu vermeiden, wird das Gasgemisch vor dem Auftreffen auf die Probe zusätzlich durch eine mit sterilem Wasser gefüllte Waschflasche geleitet.

Die Zellen werden in die Kanäle des μ -slide VI (ibidi) ausgesät. Die Kanäle bieten den Vorteil, dass sich die Zellen gleichmäßig bei der Aussaat verteilen. Diese Aussaat-Gefäße bieten eine dünne optische Oberfläche zur optimalen Aufnahme von Bildern im LCI-System, außerdem ist der Gasaustausch gewährleistet. Durch die 6 Kanäle können mehrere Bedingungen parallel getestet werden.

Der Scanning-Tisch der Firma Märzhäuser ermöglicht die automatisierte Aufnahme verschiedener Positionen auf einem Objektträger. Definierte Positionen können ausgewählt, angesteuert und wiederholt aufgenommen werden, der Verfahrbereich (130 mm x 100 mm) ist stufenlos einstellbar. Durch das Auswechseln der Einlegerahmen können sowohl Objektträger als auch Schalen fixiert werden. Die Steuerung des Tisches sowie der Aufnahmebedingungen wurden über die Software Metafer der Firma MetaSystems vorgenommen.

Im Rahmen der Etablierung wurden Versuche zur Überprüfung der Bedingungen für das optimale Wachstum der Zellen im LCI-System sowie deren eventuelle Auswirkungen auf die lebenden Zellen durchgeführt. Faktoren wie Akklimatisierung der Zellen in der neuen Umgebung, Temperatur, CO₂-Begasung und Aufnahmebedingungen während des Versuchs wurden über den Mitotischen Index (MI), der die Anzahl der Zellteilungen pro Stunde an der Gesamtzellzahl angibt, untersucht. Die Bestimmung des MI stellte sich als sehr sensitive Methode für den Nachweis der Vitalität von Zellen heraus, da bereits bei kleinen Temperaturschwankungen innerhalb der Zellkultur die Werte des MI über einen Zeitraum von einigen Stunden absanken, bevor die Zellen wieder ihre ursprüngliche Teilungsgeschwindigkeit erreichten.

Den Bezugspunkt bildeten unbehandelte, im Durchlicht aufgenommene U2OS-Zellen. Unter optimalen Kulturbedingungen wurde eine sich gleichmäßig teilende, exponentiell wachsende Zellkultur erwartet. Unter Beachtung aller zuvor aufgeführten Maßnahmen ergab sich schließlich ein kaum schwankender MI über einen Zeitraum von mehreren Stunden. Die Untersuchung des MI wurde zusätzlich mit U2OS-Zellen durchgeführt, welche stabil mit dem Konstrukt GFP-53BP1, einem Marker für DSBs, transfiziert waren. Um das Konstrukt in den Zellen sichtbar zu machen, musste eine Anregung des Fluorochroms über Auflicht einer spezifischen Wellenlänge erfolgen. Dies wurde durch den Einsatz bestimmter Filtersätze (GFP-Filter) zur Filterung des Auflichts erreicht. Auch bei regelmäßiger Aufnahme mit Auf- und Durchlicht blieb der MI über mehrere Stunden stabil. Diese Vorversuche zeigten, dass die gewählten Umgebungs- und Aufnahmebedingungen optimal für das Wachstum der Zellen im LCI-System waren und die Ergebnisse der nachfolgend durchgeführten Versuche nicht beeinträchtigten oder verfälschten.

4.1.1.2 Etablierung des S-Phase-Markers RFP-LigaseI

Zur Messung des G1/S-Checkpoints muss es möglich sein, G1-Phase-Zellen von S-Phase-Zellen zu unterscheiden. So kann beurteilt werden, ob G1-Phase-Zellen einem Arrest unterliegen oder weiter im Zellzyklus in die S-Phase progressieren. Durch die Verwendung des S-Phase-Markers RFP-LigaseI (Easwaran *et al.*, 2005) konnte eine Abgrenzung der G1-Phase des Zellzyklus zur S-Phase in lebenden Zellen getroffen werden. Das Plasmid RFP-LigaseI setzt sich aus der Sequenz des Enzyms DNA-LigaseI und dem Fluorochrom *Red Fluorescent Protein* (RFP) zusammen. Die DNA-LigaseI ist vorwiegend während der S-Phase des Zellzyklus aktiv und ligiert die Okazaki-Fragmente bei der semikon-servativen Replikation (Mackenney *et al.*, 1997). Hierdurch ergibt sich ein für die S-Phase charakteristisches Muster. Nach Transfektion des Plasmids in die lebende Zelle und Anregung des exprimierten Proteins mit Auflicht im LCI-System ist es somit möglich, S-Phase-Zellen von G1- und G2-Phase-Zellen zu unterscheiden. Über die unterschiedliche Ausbildung des Musters während der Replikation der DNA im Laufe der S-Phase gelingt es außerdem, diese Phase in frühe, mittlere und späte Abschnitte zu differenzieren.

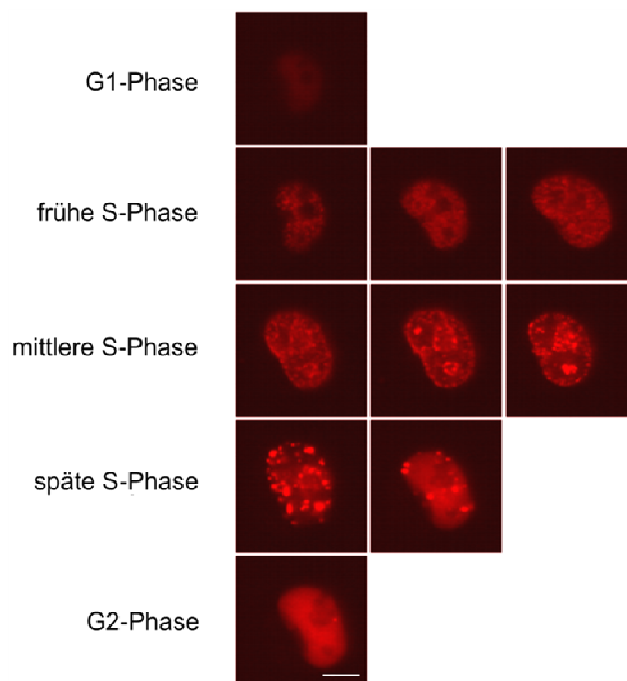


Abb. 16: Stündliche Aufnahme einer mit RFP-LigaseI transfizierten U2OS-Zelle

Exponentiell wachsende U2OS-Zellen wurden mit RFP-LigaseI transfiziert und stündlich im LCI-System mit Durchlicht und Auflicht (TxR-Filter) aufgenommen. Durch die spezifische Verteilung des RFP-gekoppelten Proteins DNA-LigaseI kann die S-Phase in lebenden Zellen bestimmt werden. Das charakteristische Muster des LigaseI-Proteins wird während der Replikation sichtbar. Hier binden LigaseI-Proteine, die während der G1- und G2-Phase diffus verteilt im Zellkern vorliegen, an entstehende Replikationsgabeln. Durch das sich verändernde Muster ist zudem eine Unterscheidung in frühe, mittlere und späte S-Phase möglich. Gezeigt ist der Übergang einer Zelle in der G1-Phase, in der RFP-LigaseI noch diffus im Zellkern verteilt vorliegt, zur frühen S-Phase, in der sich das LigaseI-Muster als kleine, über den gesamten Zellkern verteilte Punkte zeigt. Die mittlere S-Phase ist dadurch gekennzeichnet, dass sich die LigaseI-Foci am Rand des Zellkerns und um die Nucleoli herum anordnen, schließlich werden sie in der späten S-Phase größer und verschwinden. In der G2-Phase ist das Muster nicht mehr erkennbar (Maßstab = 10 µm; Aufnahmebedingungen: 1 Ebene, Belichtungszeit AL: 700 ms mit TxR-Filter).

Die Etablierung der Methode erfolgte in U2OS-Zellen. Der Vorteil dieser Osteosarkom-Zellen gegenüber primären Zellen liegt darin, dass sie relativ einfach zu transfizieren sind und stärker proliferieren. U2OS-Zellen sind in der Literatur als p53-profizient beschrieben und sollen einen funktionalen G1/S-Checkpoint besitzen (Allan *et al.*, 1999, Nghiem *et al.*, 2001). Das Konstrukt RFP-LigaseI wurde zunächst chemisch in U2OS-Zellen transfiziert und eine stabil RFP-LigaseI exprimierende Zelllinie hergestellt. Hierfür wurden transfizierte Zellen vereinzelt und in 96-Well-Platten ausgesät. Durch optische Begutachtung wurde sichergestellt, dass sich in jedem Well eine Zelle befand. Das Zellkulturmedium wurde mit dem für die Selektion von RFP-LigaseI exprimierenden Zellen entsprechenden

Antibiotikum G418 versehen. Das Wachstum der ausgesäten Zellen in den Wells wurde regelmäßig kontrolliert und auf die Expression von RFP-Ligasel überprüft. Schließlich wurde ein Klon zur weiteren Verwendung ausgewählt und vermehrt.

Um zu beurteilen, ob die Transfektion mit dem Plasmid RFP-Ligasel oder die Aufnahme der Zellen mit Auflicht zur Anregung des Fluorochroms das Wachstum der Zellen beeinflusste, wurde der MI der Zellen über einen längeren Zeitraum bestimmt.

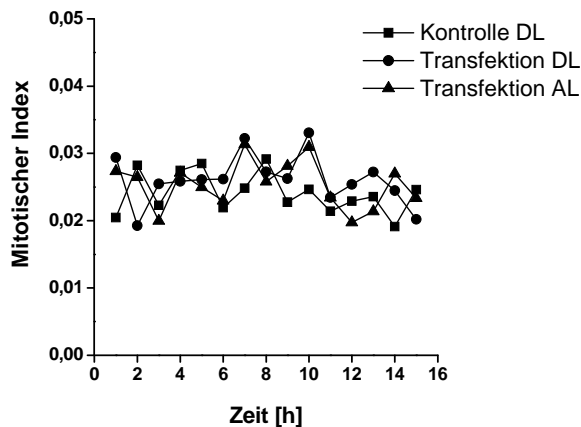


Abb. 17: Mitotischer Index von U2OS-Zellen

U2OS-Zellen wurden mit dem Konstrukt RFP-Ligasel chemisch transfiziert oder untransfiziert belassen, 24 h später in μ -slides VI ausgesät und im Brutschrank 48 h inkubiert, bevor sie in das LCI-System überführt wurden. Die auf 37°C temperierte Inkubationskammer wurde mit 5 % CO₂ begast. Von den Zellen wurden in 100-facher Vergrößerung mit UV-Filter und 6 % Neutralfilter im Abstand von 30 min Bilder mit DL oder zusätzlich AL (TxR-Filter, Belichtungszeit 700 ms) über einen Zeitraum von 15 h aufgenommen. Die Mitosen von jeweils 2 Bildern wurden zusammengefasst, um den MI pro Stunde zu erhalten. Auf der Abszisse ist die Aufnahmezeit in h, auf der Ordinate die Häufigkeit der Zellteilungen als MI dargestellt.

Hierfür wurden in einen Kanal eines μ -slides VI untransfizierte U2OS-Zellen und zusätzlich in zwei weitere Kanäle mit RFP-Ligasel transfizierte U2OS-Zellen ausgesät und zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Nach Überführung des μ -slides VI in das auf 37°C temperierte und mit 5 % CO₂ gesättigte LCI-System wurden über die Software Metafer (MetaSystems) Positionen definiert, welche in einem Abstand von 30 min über einen Zeitraum von 15 h ständig aufgenommen wurden. Die untransfizierten Kontrollzellen und ein Kanal der transfizierten Zellen wurden nur mit Durchlicht, der zweite Kanal mit transfizierten Zellen wurde zusätzlich noch mit Auflicht (TxR-Filter) aufgenommen.

Zu Beginn der Aufnahmen zeigten die Werte der behandelten und unbehandelten Zellen leichte Abweichungen voneinander, sie lagen für die nur mit Durchlicht beobachteten, untransfizierten Kontrollzellen bei einem Mitotischen Index von 2,0 %, für transfizierte Zellen bei 2,9 % (Abb. 17). Der Wert für transfizierte, mit Auflicht aufgenommene Zellen lag bei 2,7 %. Die Mitotischen Indices der drei untersuchten Proben pendelten sich ab 6 h bis zum Ende der Beobachtungszeit bei 15 h zwischen 2 % und 3 % mitotischer Zellen ein. Verglichen mit den Werten der untransfizierten und nur mit DL aufgenommenen Kontrolle waren keine tendenziellen Unterschiede zu transfizierten und mit Auflicht aufgenommenen Zellen zu erkennen.

Weder die Transfektion noch die Aufnahme mit Auflicht zur Anregung des Fluorochroms beeinflusste das Teilungsverhalten der Kultur, was eine gute Ausgangsposition für die folgenden Versuche darstellte.

4.1.1.3 Untersuchung des G1/S-Checkpoints in U2OS-Zellen mittels LCI

Nach der Optimierung der Bedingungen des LCI-Systems und der Etablierung des S-Phase-Markers RFP-LigaseI wurde der G1/S-Checkpoint in transfizierten U2OS-Zellen untersucht. Hierzu sollte ermittelt werden, wie viele bestrahlte G1-Phase-Zellen im Vergleich zu unbestrahlten G1-Phase-Zellen in die S-Phase gelangten.

Für dieses Experiment wurden die mit RFP-LigaseI transfizierten U2OS-Zellen in zwei Kanäle eines μ -slide VI ausgesät und 48 h im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die exponentiell wachsenden Zellen je eines Kanals mit 1 Gy, 2 Gy oder 10 Gy bestrahlt, der zweite Kanal wurde unbestrahlt belassen. Die Zellen wurden anschließend weiter im LCI-System inkubiert. Über einen Zeitraum von 24 h wurden stündlich Aufnahmen bei 400-facher Vergrößerung sowohl der unbestrahlten als auch der bestrahlten Zellen im Auf- (TxR-Filter) und Durchlichtmodus angefertigt. Zu jedem aufgenommenen Zeitpunkt wurde die Anzahl der G1-Phase-Zellen, die in die S-Phase gelangten, quantifiziert und über den gesamten Versuchszeitraum akkumuliert (Abb. 18).

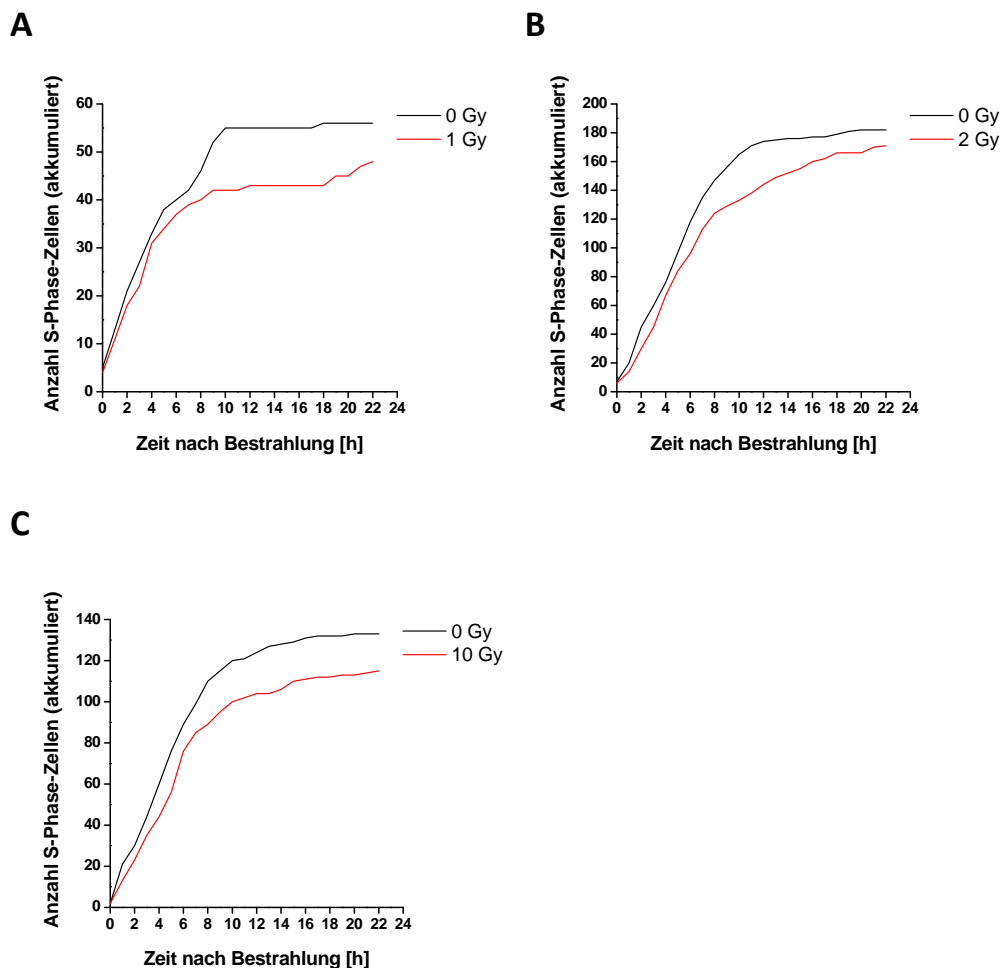


Abb. 18: Progression von U2OS-Zellen aus der G1-Phase in die S-Phase

Mit RFP-LigaseI transfizierte, exponentiell wachsende U2OS-Zellen wurden mit 1 Gy (A), 2 Gy (B) oder 10 Gy (C) bestrahlt oder unbestrahlt belassen. Die Zellen wurden anschließend im LCI-System mit Durchlicht und Auflicht (TxR-Filter, Belichtungszeit 700 ms) stündlich über einen Zeitraum von 24 h aufgenommen. Die von der G1-Phase zur S-Phase übertretenden Zellen wurden aufgrund des sich ausbildenden LigaseI-Musters identifiziert und die Anzahl der Zellen akkumuliert. Die Ordinate zeigt die Zeit nach Bestrahlung der Zellen, die Abszisse die akkumulierte Anzahl von in die S-Phase eingetretenen Zellen.

Die unbestrahlten Proben zeigten innerhalb der ersten 6 h bis 8 h eine konstante Rate von in die S-Phase eintretenden Zellen. Anschließend nahm die Rate ab, bis sich nach 10 h bis 14 h ein Plateau ausbildete. Das Plateau lässt sich dadurch erklären, dass bei der Auswertung nur Zellen berücksichtigt wurden, welche in der G1-Phase bestrahlt wurden bzw. die sich während des Beobachtungszeitraums nicht geteilt hatten. Diese Population war nach einer bestimmten Zeit „aufgebraucht“ und es konnten keine weiteren Zellen aus der G1-Phase in die S-Phase gelangen. Nach Bestrahlung der Proben mit 1 Gy, 2 Gy und 10 Gy konnte eine leichte, dosisabhängige Verzögerung des S-Phase-Eintritts in den ersten 6 h bis 8 h festgestellt werden. Nach Bestrahlung mit 1 Gy traten ab 8 h keine G1-Phase-Zellen mehr in die S-Phase ein. Ein erneuter Eintritt von G1-Phase-Zellen in die S-Phase war erst wieder ab 22 h nach Bestrahlung zu erkennen. Bei Bestrahlung mit 2 Gy und 10 Gy war dieser Effekt ebenfalls zu beobachten, aber weniger stark ausgeprägt als bei der geringeren Dosis von 1 Gy.

Mit dieser Versuchsanordnung gelang es prinzipiell, das Einsetzen des G1/S-Checkpoints nachzuweisen. Eine Verzögerung des Einsetzens des G1/S-Checkpoints war bei allen Dosen erkennbar. Das vollständige Einsetzen des Checkpoints nach etwa 6 h war allerdings schwach ausgeprägt. Tumorzellen besitzen generell unabhängig vom p53-Status eine verminderte Fähigkeit, einen G1-Arrest nach Bestrahlung zu aktivieren. Dies zeigt sich konsistent mit Beobachtungen, dass Tumorzellen Veränderungen in Genen besitzen, von denen viele an der Zellzyklus-Kontrolle während der G1-Phase beteiligt sind (Syljuåsen *et al.*, 1999). Durch die starke Proliferation der Zellen sind in der unbestrahlten Probe bereits nach 10 h alle auswertbaren G1-Phase-Zellen in die S-Phase progressiert. Bei einem langsam einsetzenden Checkpoint fällt die Messung von Unterschieden zur bestrahlten Probe daher schwer.

Die anfängliche Verwendung der Tumorzellen im LCI-System hatte zunächst den praktischen Vorteil der leichteren Transfizierbarkeit der Zellen. Da jedoch die Verlässlichkeit der Ergebnisse der U2OS-Zellen in Bezug auf das Einsetzen des G1/S-Checkpoints fragwürdig war, wurden für die weiteren Untersuchungen des Checkpoints hTert-immortalisierte Fibroblasten (82-6hTert) ausgewählt. Da primäre humane Fibroblasten aufgrund der Verkürzung ihrer Telomere bei jeder Teilung nur zu einer begrenzten Anzahl von Zellteilungen fähig sind, wurden die Zellen über Retroviren mit Vektoren transfiziert, welche für die katalytische Untereinheit der *human Telomerase reverse transcriptase* (hTert) codieren (Bodnar *et al.*, 1998). Die Telomere dieser transfizierten Zellen sind verlängert, die Zellen teilen sich verstärkt. Die WT-Zelllinie 82-6hTert besitzt, wie auch primäre Fibroblasten, alle Faktoren, Proteine und einen stabilen Karyotyp, um das vollständige Einsetzen des G1/S-Checkpoints zu gewährleisten (Sharma *et al.*, 2003).

4.1.1.4 Etablierung einer Methode zur Messung von DSB-Reparatur und G1/S-Checkpoint in humanen Fibroblasten mittels LCI

Durch Bestrahlung der Zellen mit IR zur Untersuchung des G1/S-Checkpoints wurden DSBs in den Zellen induziert, die das Signal zur Aktivierung des Checkpoints darstellen. Um Aussagen über die Sensitivität des G1/S-Checkpoints treffen zu können, war es wichtig, die DSBs sowohl in der G1-Phase als auch der S-Phase quantifizieren zu können. Zur gleichzeitigen Untersuchung des Übertritts

von Zellen aus der G1-Phase in die S-Phase und der DSB-Reparatur wurden 82-6hTert-Zellen mit zwei Markern transfiziert. Zusätzlich zum S-Phase-Marker RFP-Ligasel wurde ein Plasmid, welches für den DSB-Marker 53BP1 codiert, transfiziert (Lukas *et al.*, 2004). 53BP1 wurde hierfür mit dem *Green Fluorescent Protein* (GFP) gekoppelt. Nach Expression des Plasmids und dem Auftreten von DSBs akkumuliert GFP-53BP1 am Ort des Schadens und der Focus wird nach Anregung des Fluorochroms mit Auflicht sichtbar. Diese Foci kolokalisieren unter anderem mit phosphoryliertem H2AX (γ -H2AX) (Wang *et al.*, 2002). Ein Focus entspricht hierbei einem DSB.

Im Vorfeld dieser Fragestellung wurden mehrere Kontrollversuche durchgeführt. Sie betrafen die Vitalität und Reparaturfähigkeit der Zellen nach Transfektion und die Sensitivität der Detektion im Vergleich zur Immunfluoreszenz-Mikroskopie.

4.1.1.5 Etablierung der Transfektion

Zunächst wurde die Effizienz einer chemischen Transfektion der 82-6hTert-Zellen mit den Konstrukten RFP-Ligasel und GFP-53BP1 getestet. Wegen der schlechten Transfizierbarkeit der Fibroblasten wurde zur Verbesserung dieses Umstands die Transfektion der Zellen mittels Elektroporation etabliert und die Zellen wurden transient transfiziert.

Wie nach der chemischen Transfektion von U2OS-Zellen (Kapitel 4.1.1.2) wurde auch nach der Elektroporation von 82-6hTert-Zellen der Einfluss der Transfektion auf das Teilungsvermögen der Zellen überprüft. Hierzu wurden in einen Kanal eines μ -slides VI untransfizierte 82-6hTert-Zellen und in einen zweiten Kanal mit RFP-Ligasel und GFP-53BP1 transfizierte 82-6hTert-Zellen ausgesät und zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Nach Überführung des μ -slides VI in das LCI-System wurden über die Software Metafer Positionen definiert, welche in einem Abstand von 60 min über einen Zeitraum von 24 h aufgenommen wurden. Die untransfizierten 82-6hTert-Zellen wurden dabei nur mit Durchlicht, die transfizierten Zellen mit Durchlicht und Auflicht (TxR-Filter und GFP-Filter) aufgenommen (Abb. 19).

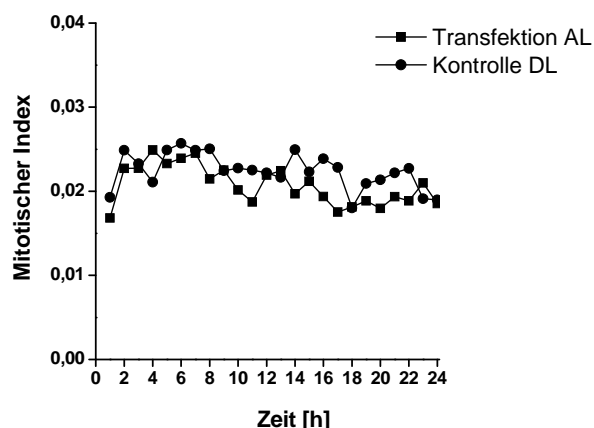


Abb. 19: Mitotischer Index von transfizierten 82-6hTert-Zellen

82-6hTert-Zellen wurden über Elektroporation mit den Plasmiden RFP-Ligasel und GFP-53BP1 transient transfiziert, 24 h später in μ -slides VI ausgesät und im Brutschrank 48 h inkubiert, bevor sie in das LCI-System überführt wurden. Die Inkubationskammer war auf 37°C temperiert und wurde mit 5 % CO₂ begast. Von den Zellen wurden in 100-facher Vergrößerung mit UV-Filter und 6 % Neutralfilter im Abstand von 1 h Bilder mit DL und AL (TxR-Filter, Belichtungszeit 350 ms; GFP-Filter, Belichtungszeit 350 ms) über einen Zeitraum von 24 h aufgenommen. Die Mitosen eines Bildes ergaben den Mitotischen Index pro Stunde. Auf der Abszisse ist die Aufnahmezeit in h, auf der Ordinate die Häufigkeit der Zellteilungen als MI dargestellt.

Der MI der untransfizierten und nur mit Durchlicht aufgenommenen 82-6hTert-Zellen lag in der ersten Stunde der Aufnahme bei 1,9 %. Im Laufe der 24 h dauernden Aufnahme stabilisierte sich der Wert und schwankte leicht zwischen 2 % und 2,5 %. Die transfizierten und mit Durchlicht und

Auflicht aufgenommenen Zellen zeigten einen Anfangswert von 1,7 %, pendelten sich im Verlauf der Aufnahme aber ebenso wie die Kontrolle zwischen 2 % und 2,5 % ein. Der leichte Abfall des MI, den man sowohl bei untransfizierten als auch bei transfizierten Zellen erkennen konnte, lag an der zunehmenden Dichte der Kultur und der damit verbundenen langsameren Teilung der Zellen. Der etwas geringere MI von 82-6hTert-Zellen im Vergleich zu U2OS-Zellen lag in der geringeren Proliferationsfähigkeit der Fibroblasten-Zellen begründet. Insgesamt konnte kein signifikanter Unterschied in der Teilungsrate zwischen untransfizierten und transfizierten Zellen über den Beobachtungszeitraum festgestellt werden.

4.1.1.6 Etablierung von GFP-53BP1 als DSB-Marker

Um DSBs in lebenden Zellen über GFP-53BP1 verlässlich quantifizieren zu können, wurde die Kolokalisation von GFP-53BP1 mit den etablierten DSB-Markern γ -H2AX und 53BP1 verglichen. Die Histonvariante des H2A wird im Bereich von mehr als einem Megabasenpaar um einen DSB phosphoryliert und gilt als eines der ersten Proteine, die in der DNA-Schadensantwort involviert sind (Rogakou *et al.*, 1998).

Mit GFP-53BP1 transfizierten 82-6hTert-Zellen wurden 2 h nach Bestrahlung mit 1 Gy fixiert und gegen 53BP1 oder γ -H2AX gefärbt.

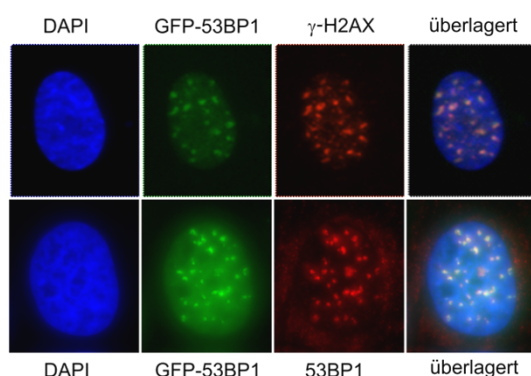


Abb. 20: Kolokalisation von GFP-53BP1, γ -H2AX- und 53BP1-Foci in der Immunfluoreszenz

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen von mit GFP-53BP1 transfizierten 82-6hTert-Zellen. Zur Überprüfung der Kolokalisation zwischen fixiertem GFP-53BP1 (grün) und γ -H2AX sowie fixiertem GFP-53BP1 (grün) und 53BP1 wurden exponentiell wachsende 82-6hTert-Zellen mit 1 Gy bestrahlt, nach 2 h fixiert und über eine Immunfluoreszenz-Färbung gegen γ -H2AX (rot) und 53BP1 (rot) dargestellt. Zusätzlich wurde eine Kernfärbung mittels DAPI durchgeführt. Die Zellen wurden in 630-facher Vergrößerung dokumentiert.

Die γ -H2AX- und auch die 53BP1-Foci waren etwas ausgeprägter und heller als die fixierten GFP-53BP1-Foci. Sowohl fixiertes GFP-53BP1 und γ -H2AX, als auch fixiertes GFP-53BP1 und 53BP1 kolokalisierten vollständig. Es konnte bestätigt werden, dass in diesem Zellsystem nach Bestrahlung alle DSBs, die mit γ -H2AX und 53BP1 nachgewiesen wurden, auch mit GFP-53BP1 quantifiziert werden können.

Um festzustellen, ob die transiente Transfektion durch Elektroporation die DSB-Reparaturkapazität der 82-6hTert-Zellen beeinträchtigt, wurden mit GFP-53BP1 transfizierten und nicht transfizierten Zellen mit 1 Gy bestrahlt. Es erfolgte eine Zugabe von Aphidicolin zur Unterscheidung von G1-, S- und G2-Phase-Zellen im Scanning-Ansatz (Beucher *et al.*, 2009). Durch den Polymerase-Inhibitor Aphidicolin arretiert die Zelle während der Replikation in der S-Phase. Vermutlich erfolgt dadurch eine Aktivierung von ATR und ein Einsetzen der DNA-Schadensantwort. H2AX wird in einem starken Maß phosphoryliert, sodass S-Phase-Zellen eine pannukleäre γ -H2AX-Färbung aufweisen und von Zellen der G1- und der G2-Phase mit einer geringen γ -H2AX-Intensität unterscheidbar werden. Die

Unterscheidung von G1-, S- und G2-Phase-Zellen wurde zudem anhand der Intensität der DAPI-Färbung über den DNA-Gehalt der Zellen getroffen. Nach Einscannen der Zellen und Auftragung des γ -H2AX- gegen das DAPI-Signal stellt sich die S-Phase im *DotPlot* als Bogen über G1- und G2-Phase-Zellen dar und kann bei der Auswertung ausgegrenzt werden.

Die Zellen wurden nach einer Reparaturzeit von 15 min, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h fixiert und gefärbt. Die mit GFP-53BP1 transfizierten Zellen wurden gegen γ -H2AX gefärbt, untransfizierte Zellen gegen γ -H2AX und 53BP1. Anschließend wurde eine Reparaturkinetik durch Quantifizierung der Foci erstellt (Abb. 21). So konnte einerseits die Kolokalisation zwischen 53BP1 und γ -H2AX, andererseits die Reparaturkapazität von transfizierten Zellen und untransfizierten Zellen gegenüber DSBs nach Bestrahlung untersucht werden.

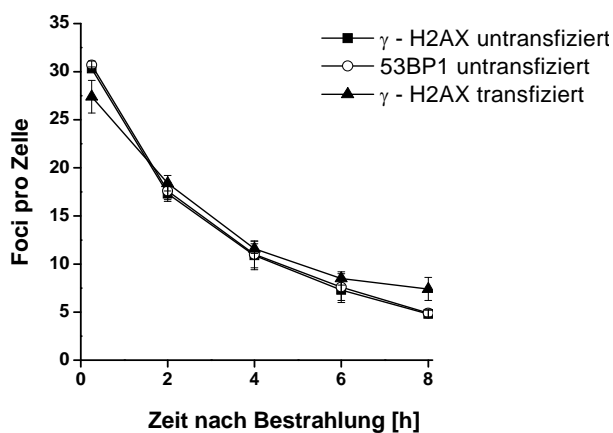


Abb. 21: Reparaturkinetik transfizierter und untransfizierter 82-6hTert-Zellen

Exponentiell wachsende 82-6hTert-Zellen wurden über Elektroporation mit dem Konstrukt GFP-53BP1 transfiziert oder untransfiziert belassen. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion in μ -slides VI ausgesät und 48 h im Brutschrank inkubiert. Nach Bestrahlung mit 1 Gy wurde Aphidicolin zu den Zellen gegeben, um bei der späteren Auswertung G1-Phase, S-Phase und G2-Phase im Scanning-Ansatz unterscheiden zu können. Die Immunfluoreszenz-Färbung erfolgte nach Fixierung nach Reparaturzeiten von 15 min, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h in untransfizierten Zellen gegen γ -H2AX und 53BP1, in mit GFP-53BP1 transfizierten Zellen nur gegen γ -H2AX. Die Foci wurden mikroskopisch in je 40 G1-Phase-Zellen ausgewertet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung zwischen 2 unabhängigen Experimenten an.

Der Induktionswert der γ -H2AX- und 53BP1-Foci in untransfizierten 82-6hTert-Zellen lag in G1-Phase-Zellen bei etwa 30 Foci. Der Reparaturverlauf über 8 h war für beide DSB-Marker nahezu identisch. Beim letzten Reparaturzeitpunkt zeigten G1-Phase-Zellen einen Wert von 6 Foci pro Zelle. In mit GFP-53BP1 transfizierten 82-6hTert-Zellen lag der Induktionswert für γ -H2AX etwa 4 Foci unter dem Wert der untransfizierten Zellen. Bei Reparaturzeiten zwischen 2 h und 6 h war kein Unterschied in der Anzahl der Foci pro Zelle zwischen transfizierten und untransfizierten Zellen erkennbar. Allerdings lag der Fociwert nach 8 h Reparatur 2 Foci höher als bei untransfizierten Zellen. Die Werte der Foci der transfizierten Zellen lagen bei 15 min etwas niedriger, bei 8 h etwas höher als bei untransfizierten Zellen. Insgesamt jedoch zeigten alle Reparaturkurven einen nahezu identischen Verlauf für die Reparatur von DSBs nach 1 Gy. Das DSB-Level ist durch Elektroporation und Transfektion nicht erhöht, und die Reparaturkapazität der transfizierten Zellen wurde nicht beeinträchtigt.

4.1.2 Reparaturmessungen im LCI-System mittels GFP-53BP1-Foci

Um sicherzustellen, dass die während eines LCI-Experiments gewählten Aufnahmebedingungen keine zusätzlichen Foci induzieren oder Einfluss auf das Reparaturvermögen der Zellen haben, wurde eine vollständige Reparaturkinetik mit GFP-53BP1-Foci ausgewertet. Die GFP-53BP1-Foci wurden

hierfür in Bildern von G1-Phase-Zellen gezählt, die über das LCI-System aufgenommen wurden (Abb. 22 A). Anschließend sollte die Reparaturkinetik der G1-Zellen der LCI-Daten noch mit der Reparaturkinetik von γ -H2AX in G1-Zellen der Immunfluoreszenz-Mikroskopie verglichen werden, um die Sensitivität der Detektion und Auswertung der LCI-Foci im Vergleich zu Foci der Immunfluoreszenz-Mikroskopie einschätzen zu können.

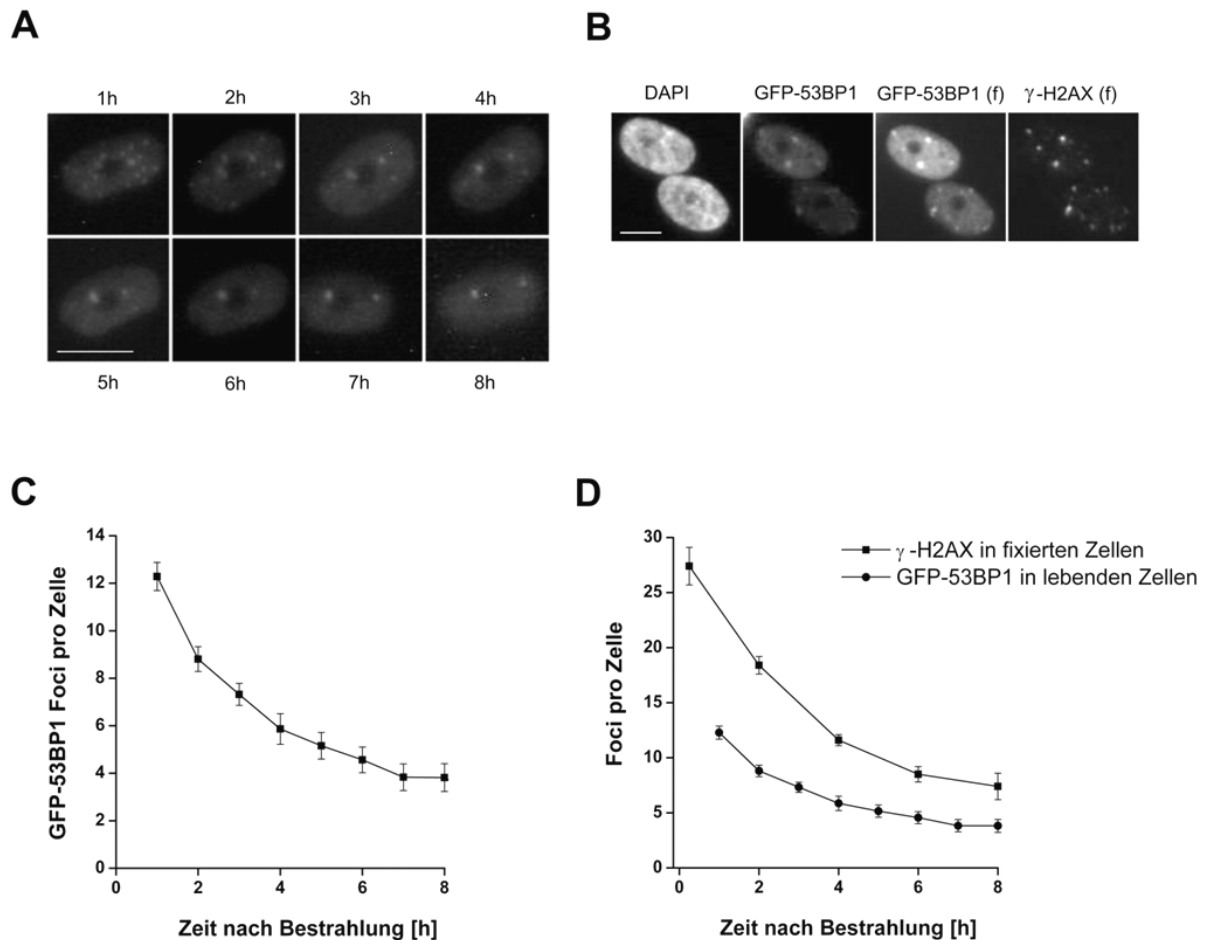


Abb. 22: DSB-Reparaturmessungen mittels LCI und Immunfluoreszenz-Mikroskopie in 82-6hTert-Zellen nach IR

(A und C) Exponentiell wachsende 82-6hTert-Zellen wurden mit RFP-Ligase und GFP-53BP1 transient transfiziert, 24 h später in einem μ -slide VI ausgesät, nach 48 h mit 1 Gy bestrahlt und das GFP-53BP1-Signal (GFP-Filter, 350 ms, 3 Ebenen mit 900 μ m), sowie das RFP-Ligase-Signal (TxR-Filter, 350 ms, 1 Ebene) stündlich in 400-facher Vergrößerung aufgenommen (Maßstab = 10 μ m).

Zur Erstellung der Reparaturkinetik in lebenden Zellen wurde die Anzahl von GFP-53BP1-Foci in einer Gruppe von 82-6hTert-Zellen, welche 6 bis 9 h vor Eintritt in die S-Phase mit 1 Gy bestrahlt wurden, am Bildschirm ausgewertet. Über einen Zeitraum von 8 h wurden stündlich DSBs in denselben Zellen gezählt, da jede Stunde festgelegte Positionen aufgenommen wurden. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler zwischen den ausgewerteten Zellen dar.

(B) 82-6hTert-Zellen wurden mit GFP-53BP1 transfiziert, 24 h später in ein μ -slide VI ausgesät und nach 48 h mit 1 Gy bestrahlt. 2 h nach Bestrahlung wurde das GFP-53BP1-Signal in lebenden Zellen an festgelegten Positionen auf dem μ -slide VI im LCI-System in 400-facher Vergrößerung mit einer Belichtungszeit von 350 ms und 3 Ebenen (900 μ m) aufgenommen, die Zellen danach sofort fixiert und gegen γ -H2AX gefärbt. Die gleichen Positionen wurden nochmals eingeschaut und dabei das γ -H2AX-Signal über den TxR-Filter unter den gleichen Bedingungen wie zuvor GFP-53BP1 aufgenommen. Die Kolokalisation am Bildschirm zwischen nativem GFP-53BP1, fixiertem (f) GFP-53BP1 und γ -H2AX ist gegeben, allerdings sind die γ -H2AX-Foci etwas deutlicher erkennbar als GFP-53BP1-Foci (Maßstab = 10 μ m).

(D) Zur Erstellung der Reparaturkinetik wurden 82-6hTert-Zellen auf Deckgläschen ausgesät, nach 48 h mit 1 Gy bestrahlt, nach 15 min, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h fixiert und gegen γ -H2AX gefärbt. Die Foci wurden bei 630-facher Vergrößerung am Mikroskop ausgezählt, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus 2 unabhängigen Experimenten. Zum direkten Vergleich wurde in diesem Graphen zusätzlich die Reparaturkinetik mittels GFP-53BP1-Foci in lebenden Zellen (C) dargestellt.

Die Auswertung der GFP-53BP1-Foci in G1-Phase-Zellen im LCI-System zeigte nach Bestrahlung mit 1 Gy einen Induktionswert von 12 Foci, gefolgt von einer schnellen Abnahme der DSBs innerhalb von 4 h auf 6 Foci. Ab 6 h nach Bestrahlung erfolgte die Abnahme der DSBs langsamer, so dass nach 8 h noch 4 Foci detektierbar waren (Abb. 22 C).

Der Vergleich der Werte der mittels LCI aufgenommenen und am Bildschirm ausgewerteten GFP-53BP1-Foci zur γ -H2AX-Kinetik in fixierten und am Mikroskop ausgewerteten Zellen (Kapitel 4.1.1.6) zeigte ein Verhältnis von 1:2. Für jeden vergleichbaren Reparaturzeitpunkt wurden am Bildschirm unter LCI-Bedingungen jeweils halb so viele GFP-53BP1-Foci gezählt wie bei der Auswertung der γ -H2AX-Foci am Mikroskop (Abb. 22 B, D).

Beim Vergleich von GFP-53BP1 in lebenden Zellen, am Bildschirm ausgewertet und γ -H2AX in fixierten Zellen, am Mikroskop ausgewertet, war ein gleicher Verlauf der Reparaturkinetiken erkennbar. Die Aufnahmebedingungen induzierten keine zusätzlichen Foci und GFP-53BP1 eignet sich zur Reparaturmessung. Allerdings muss beachtet werden, dass das tatsächliche Level der GFP-53BP1-Foci stets um die Hälfte unterschätzt wird.

Da sich bei der Auswertung von Foci am Bildschirm und am Mikroskop ein Verhältnis von 1:2 ergab, sollte noch einmal systematisch überprüft werden, ob die Halbierung der Focizahl tatsächlich nur durch die Auswertung am Bildschirm zustande kam. Zur Überprüfung wurden Versuche zur Auswertung von GFP-53BP1, 53BP1 und γ -H2AX-Foci an Mikroskop und Bildschirm durchgeführt (Abb. 23).

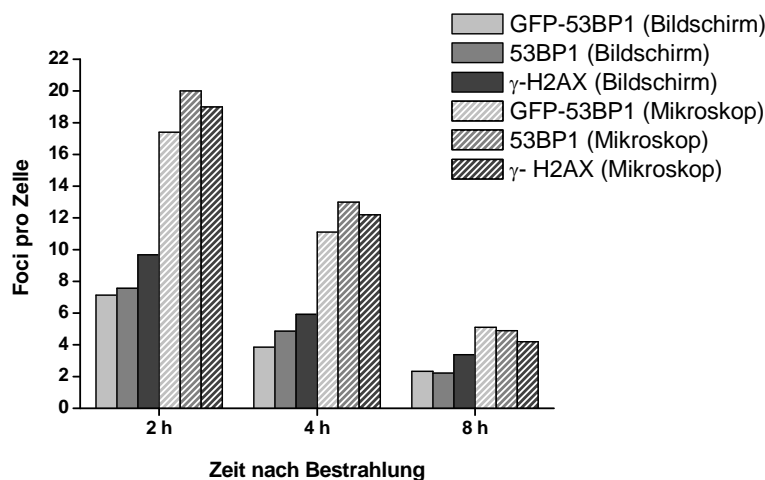


Abb. 23: Vergleich zwischen Auszählung der DSBs am Mikroskop und am Bildschirm

82-6hTert-Zellen wurden über Elektroporation mit GFP-53BP1 und RFP-Ligase transfiziert und 24 h nach Transfektion im μ -slide VI ausgesät. 48 h nach Aussaat wurden die transfizierten Zellen mit 1 Gy bestrahlt und in den Inkubator des LCI-Systems gestellt. Nach 2 h, 4 h und 8 h Reparaturzeit wurden die Zellen einmal mit Durchlicht und Auflicht (GFP-Filter) abgescannt, um die GFP-53BP1-Foci aufzunehmen und die jeweiligen Zeitpunkte sofort fixiert. Nach Fixierung erfolgte die Färbung entweder gegen γ -H2AX oder 53BP1 und die gleichen Positionen wie vor der Fixierung wurden nochmals abgescannt. So konnten GFP-53BP1-Foci, γ -H2AX- oder 53BP1-Foci später über eine Software (ACDsee) am Bildschirm in G1-Phase-Zellen ausgewertet werden. Zusätzlich wurden die GFP-53BP1-Foci, γ -H2AX- und 53BP1-Foci der fixierten G1-Zellen am Mikroskop ausgewertet und mit den Foci-Werten der Bildschirm-Auswertung verglichen. Die Aufnahmen mit dem LCI-System erfolgten in 400-facher Vergrößerung, am Mikroskop wurden die Foci der fixierten Zellen bei 630-facher Vergrößerung ausgezählt.

Nach Bestrahlung mit 1 Gy wurden zu den Zeitpunkten 2 h, 4 h und 8 h GFP-53BP1-Foci in lebenden Zellen, 53BP1 und γ -H2AX nach Fixierung und Färbung zu den entsprechenden Zeitpunkten im LCI-

System bei 400-facher Vergrößerung abgescannt. GFP-53BP1-Foci, sowie 53BP1- und γ -H2AX-Foci wurden nochmals über Immunfluoreszenz-Mikroskopie bei 630-facher Vergrößerung in G1-Phase-Zellen gezählt.

In beiden Fällen, sowohl bei der Auszählung am Bildschirm als auch am Mikroskop, nahm die Focizahl über die Zeit nach Bestrahlung ab. Nach einer Reparaturzeit von 2 h lag der Wert bei 18-20 Foci, wobei GFP-53BP1-Foci am niedrigsten, 53BP1-Foci am höchsten lagen. Diese Tendenz war auch 4 h nach Bestrahlung noch vorhanden, die Fociwerte bewegten sich zwischen 13 und 15. Nach 8 h Reparaturzeit waren noch 5-6 Foci vorhanden, GFP-53BP1 und 53BP1 zeigten fast denselben Wert. Die durchschnittliche Anzahl der Foci von am Bildschirm ausgewerteten Zellen war im Vergleich zu den am Mikroskop ausgewerteten deutlich geringer. 2 h nach Bestrahlung waren noch 7-10 Foci vorhanden, 4 h nach Bestrahlung zwischen 5 und 7. Nach 8 h Reparaturzeit lag die Anzahl der Foci bei 3-4. Die γ -H2AX- und 53BP1-Foci lagen zu allen Zeitpunkten am höchsten. Am niedrigsten lagen die GFP-53BP1-Foci. Die Anzahl der am Bildschirm ausgezählten DSBs betrug nur etwa die Hälfte der am Mikroskop ausgezählten. In der Erkennung der Foci bot die Zählung am Mikroskop deutliche Vorteile. Die bessere Auflösung im Vergleich zum Bildschirm und das Durchfokussieren durch den Zellkern spielen eine entscheidende Rolle in der besseren Erkennung der Foci. Bei der mikroskopischen Auswertung fiel auf, dass die GFP-53BP1-Foci bei den jeweiligen Reparaturpunkten am niedrigsten im Vergleich zu 53BP1- und γ -H2AX-Foci lagen. Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass die fixierten GFP-53BP1-Foci relativ schwach zu den über Immunfluoreszenz gefärbten 53BP1- und γ -H2AX-Foci fluoreszierten und so nicht alle erkannt und gezählt werden konnten. Bei der Auswertung am Bildschirm hingegen zeigte sich die Tendenz, dass die γ -H2AX-Foci stets höher als GFP-53BP1 und 53BP1 lagen. Diese waren im Vergleich heller, und somit waren auch schwach gefärbte DSBs viel deutlicher zu erkennen.

Bei allen ausgewerteten Zeitpunkten lag die Anzahl der am Mikroskop ausgewerteten Foci in der G1-Phase, sei es GFP-53BP1, 53BP1 oder γ -H2AX, doppelt so hoch wie bei den am Bildschirm ausgewerteten Foci.

Es konnte gezeigt werden, dass bei Anwendung der Methode des LCI keine Beeinträchtigungen von Zellen sowohl durch die Aufnahmebedingungen als auch durch die Transfektion mit GFP-53BP1 und RFP-Ligasel entstanden. Die Teilungsrate der Zellen und ihre Reparaturkapazität wichen nicht von denen unbehandelter Zellen ab, und durch die Aufnahmebedingungen wurden keine zusätzlichen DSBs induziert. Der Marker GFP-53BP1 zur Identifizierung der DSBs kolokalisiert mit etablierten Doppelstrangbruch-Markern wie γ -H2AX und 53BP1, allerdings wurde nur die Hälfte an GFP-53BP1-Foci am Bildschirm im Vergleich zur Auszählung am Mikroskop detektiert. Dieser Umstand muss bei zukünftigen Experimenten und Aussagen bezüglich der DSB-Anzahl berücksichtigt werden.

4.1.3 Zeitliche Regulation und Sensitivität des G1/S-Checkpoints mittels LCI

Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Zusammenspiels von zeitlicher Regulation des G1/S-Checkpoints und DSB-Reparatur nach IR. Nach Etablierung des LCI sollte im weiteren Verlauf der Arbeit zunächst die zeitliche Regulation des G1/S-Checkpoints in lebenden Zellen untersucht wer-

den. Darüber hinaus sollte die Bestimmung der Sensitivität des Checkpoints in Bezug auf DSBs am G1/S-Übergang erfolgen. Dies wurde durch die gleichzeitige Transfektion von 82-6hTert-Zellen mit RFP-Ligasel zur Markierung des S-Phase-Eintritts der Zellen und GFP-53BP1 zur Quantifizierung von DNA-DSBs erreicht. Mittels beider Marker war es möglich, in einzelnen, über mehrere Stunden verfolgten Zellen die Anzahl der DSBs zum Zeitpunkt des Übertritts von der G1-Phase zur S-Phase zu bestimmen (Abb. 24).

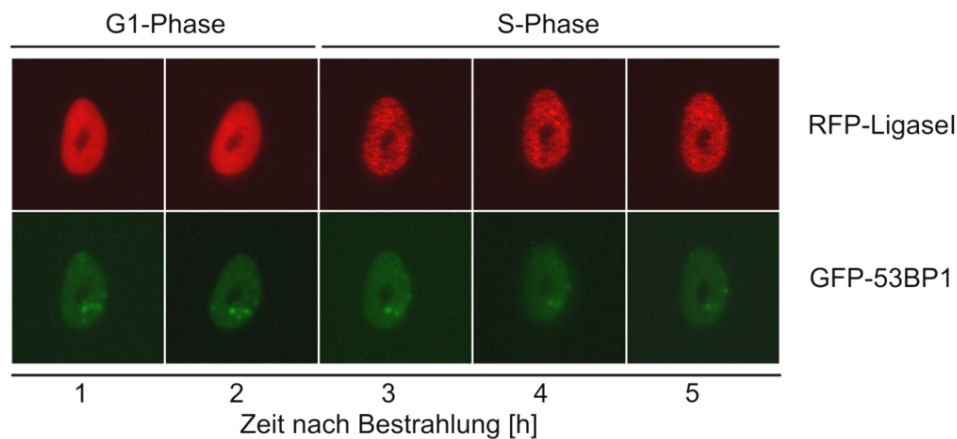


Abb. 24: 82-6hTert-Zelle transfiziert mit RFP-Ligasel und GFP-53BP1 im Übertritt von G1-Phase in S-Phase

82-6hTert-Zellen wurden mit RFP-Ligasel und GFP-53BP1 transient transfiziert. Durch das Konstrukt RFP-Ligasel wurde der Übertritt von der G1-Phase in die S-Phase durch Ausbildung eines spezifischen Musters angezeigt, GFP-53BP1-Foci machten die Anzahl der Doppelstrangbrüche nach Anregung des Fluorochroms mit Auflicht sichtbar. 1 h nach Bestrahlung der Zellen mit 1 Gy waren in der G1-Phase GFP-53BP1-Foci induziert worden, welche über den dargestellten Zeitraum von 5 h repariert wurden. Zwischen Stunde 2 und 3 nach Bestrahlung progressierte die Zelle mit GFP-3BP1 Foci in die S-Phase.

Zur Untersuchung des Einsetzens des G1/S-Checkpoints in 82-6hTert-Zellen nach Bestrahlung mit 1 Gy wurden die mit RFP-Ligasel und GFP-53BP1 transfizierten 82-6hTert-Zellen in zwei Kanäle eines μ -slide VI ausgesät und 48 h im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die exponentiell wachsenden Zellen eines Kanals mit 1 Gy bestrahlt, der zweite Kanal blieb unbestrahlt und diente als Kontrolle. Die Zellen wurden anschließend weiter im LCI-System inkubiert. Dabei wurden stündlich Aufnahmen über einen Zeitraum von 30 h in 400-facher Vergrößerung sowohl der unbestrahlten als auch der bestrahlten Zellen im Auflicht- und Durchlichtmodus angefertigt. Um die zeitliche Regulation des G1/S-Checkpoints nach IR zu untersuchen, wurden in 44 unabhängigen Experimenten bestrahlte und unbestrahlte Zellen ausgewertet, die sich noch nicht geteilt hatten und im Laufe des Aufnahmezeitraums in die S-Phase gelangten. Die Anzahl der Zellen, die in die S-Phase gelangten, wurde akkumuliert (Abb. 25).

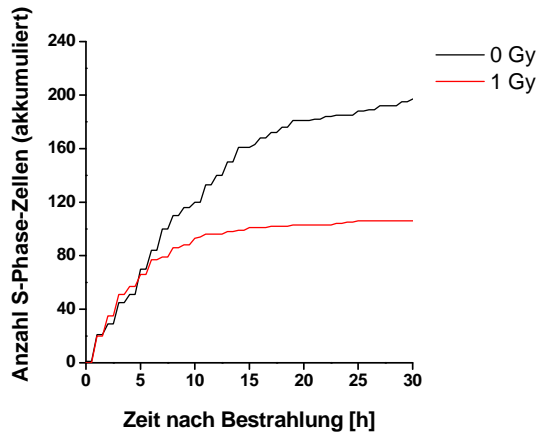


Abb. 25: Progression von Zellen aus der G1-Phase in die S-Phase im LCI-System

RFP-Ligase1 und GFP-53BP1 transfizierte 82-6hTert-Zellen wurden in die Kanäle des μ -slides VI ausgesät und 2 Tage im Brutschrank inkubiert. Die exponentiell wachsenden Zellen wurden vor der Aufnahme im LCI-System mit 1 Gy bestrahlt oder unbestrahlt belassen und anschließend im LCI-System mit DL und AL (TxR-Filter, Belichtungszeit 350 ms) stündlich über 30 h aufgenommen. Die von der G1-Phase zur S-Phase übertretenden einzelnen Zellen wurden aufgrund des sich ausbildenden Ligase1-Musters identifiziert, die Anzahl dieser Zellen akkumuliert und gegen die Zeit nach Bestrahlung aufgetragen.

Die Anzahl der unbestrahlten, in die S-Phase eintretenden Zellen nahm über einen Zeitraum von 18 h gleichmäßig zu. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes nahm die Rate der in die S-Phase eintretenden Zellen ab, was auf eine Depletion der G1-Phase zurückzuführen war. Nach Bestrahlung der Zellen mit 1 Gy konnte während der ersten 5 h nach Bestrahlung kein Unterschied in der Rate der von der G1-Phase in die S-Phase eintretenden Zellen zur Kontrolle festgestellt werden. Ab diesem Zeitpunkt bis zum Ende des Beobachtungszeitraums gelangten allerdings nur noch wenige Zellen in die S-Phase, was auf ein Einsetzen des G1/S-Checkpoints zurückzuführen sein könnte. Somit konnte in diesem Ansatz in lebenden Zellen gezeigt werden, dass der G1/S-Checkpoint etwa 5 h nach Bestrahlung einsetzt.

Die Doppeltransfektion der Zellen ermöglichte nun, in denselben Zellen den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase zu bestimmen und gleichzeitig das DSB-Level zu messen. In 91 mit 1 Gy bestrahlten Zellen und 150 unbestrahlten Zellen wurden GFP-53BP1-Foci über die gesamte Dauer des Beobachtungszeitraums quantifiziert. Aufgrund der geringen Transfektionseffizienz in den primären Fibroblasten wurden 44 unabhängige Versuche durchgeführt, welche in den folgenden Graphen zusammengefasst wurden (Abb. 26).

Die Reparaturkinetiken bestrahlter Zellen zeigten eine Abnahme der Focizahlen, eine Reparatur von DSBs fand somit statt. Allerdings war eine große Streuung zwischen den einzelnen Zellen zu erkennen, weshalb die in der G1-Phase bestrahlten Zellen relativ zu ihrem Eintritt in die S-Phase gruppiert wurden. Auf diese Weise erhielt man eine Aussage darüber, mit wie vielen DSBs Zellen in die S-Phase gelangten, bevor der Checkpoint aktiviert wurde bzw. auch zu späteren Zeiten, wenn er voll eingesetzt hatte.

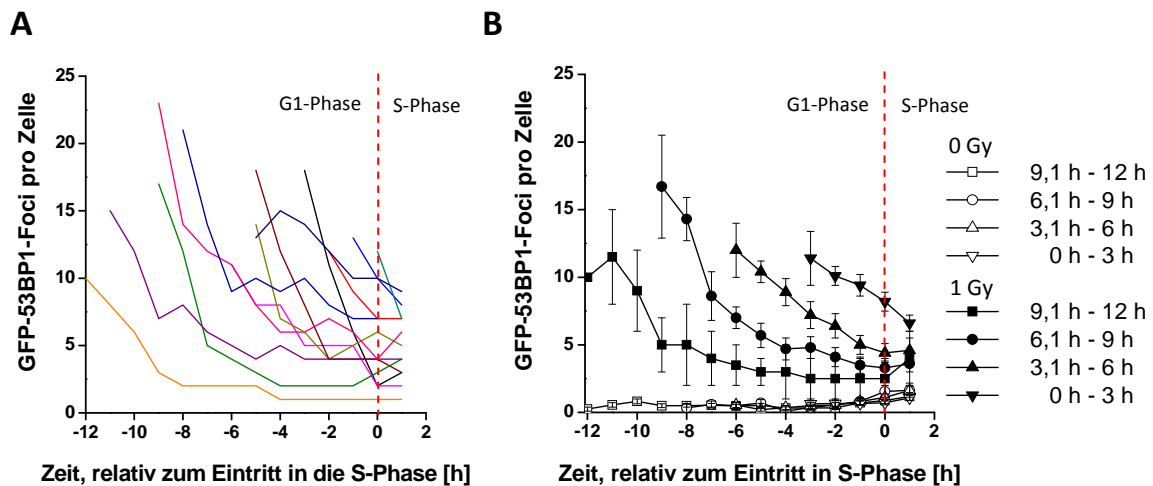


Abb. 26: Entwicklung der DSBs nach Bestrahlung mit 1 Gy in der G1-Phase und beim Übergang zur S-Phase

(A) 82-6hTert-Zellen wurden über Elektroporation mit den Konstrukten GFP-53BP1 zur Untersuchung der DNA-Doppelstrangbrüche und RFP-Ligase zur Identifikation der Zellzyklus-Phase transfiziert und in die Kanäle eines μ -slide VI ausgesät. In exponentieller Wachstumsphase wurden die Zellen mit 1 Gy bestrahlt bzw. unbestrahlt belassen und über einen Zeitraum von 24 h im *Live Cell Imaging*-System mit DL und AL (TxR-Filter, GFP-Filter, Belichtungszeit 350 ms, 1 Ebene bzw. 3 Ebenen mit 900 μ m) in 400-facher Vergrößerung aufgenommen. In den aufgenommenen Bildern wurden anschließend am Bildschirm die auftretenden GFP-53BP1-Foci in G1-Phase-Zellen ausgezählt. Der 0 h-Punkt auf der Abszisse zeigt den Zeitpunkt des Eintritts der Zellen in die S-Phase an, vor diesem Punkt befinden sich die Zellen in der G1-Phase.

(B) Die Zellen sind gruppiert dargestellt. In der bestrahlten, als auch in der unbestrahlten Probe zeigen die Gruppen die Population an Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung zwischen 0 h und 3 h, zwischen 3,1 h und 6 h, zwischen 6,1 h und 9 h und zwischen 9,1 h und 12 h vor der S-Phase befanden. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler über die ausgewerteten Zellen an.

In der unbestrahlten Probe lag die Anzahl der GFP-53BP1-Foci in allen Gruppen zwischen 0,7 und 1,5 DSBs. Die mit 1 Gy bestrahlten Zellen zeigten in allen dargestellten Gruppen eine Induktion zwischen 12 und 17 Foci. Zum Zeitpunkt des S-Phase-Eintritts zeigte die Gruppe, welche 9 h bis 12 h vor S-Phase-Eintritt bestrahlt wurde, noch 2,5 unreparierte DSBs, die zwischen 6 h bis 9 h bestrahlte Population noch 3,3 unreparierte DSBs. Die Gruppe, welche zwischen 4 h bis 6 h und 0 h bis 3 h bestrahlt wurde, zeigte noch 4,4, bzw. 8,2 unreparierte DSBs. Somit besaßen Zellen, welche zu einem späteren Zeitpunkt nach Bestrahlung in die S-Phase eintraten, zum Zeitpunkt des S-Phase-Eintritts niedrigere Foci-Werte, da die DSBs in der G1-Phase repariert werden konnten. Die Zellen traten zu allen Zeitpunkten mit einem erhöhten Focilevel in die S-Phase ein (Abb. 26). Da der G1/S-Checkpoint nur langsam einsetzt, gelangten viele Zellen besonders in den ersten 6 h nach Bestrahlung mit einer erheblichen Anzahl an DSBs in die S-Phase (Abb. 27). Zudem wurden auch zu späteren Zeitpunkten vereinzelt Zellen mit einem erhöhten Focilevel gefunden.

Zusammengefasst konnte in diesen Experimenten in lebenden Zellen gezeigt werden, dass der G1/S-Checkpoint nur langsam einsetzt. Folglich treten in den ersten 6 h viele Zellen mit einer hohen Anzahl an DSBs in die S-Phase ein.

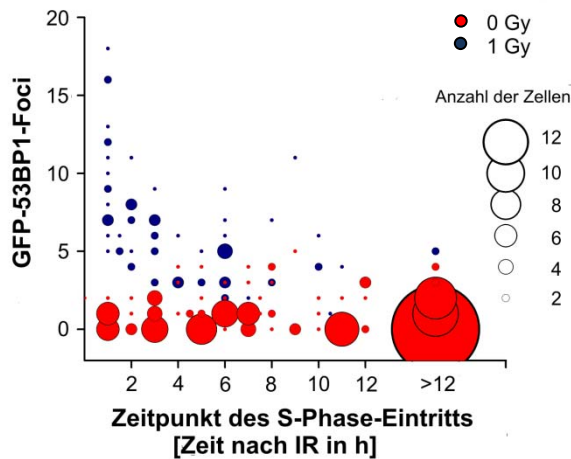


Abb. 27: Anzahl von GFP-53BP1-Foci bei S-Phase-Eintritt der Zellen

82-6hTert-Zellen wurden mit GFP-53BP1 und RFP-Ligasel transfiziert und über 24 h im LCI-System aufgenommen. Aufgetragen wurde die Anzahl der in den Zellen gezählten GFP-53BP1-Foci im ersten Bild der S-Phase. Gleichzeitig war zu erkennen, wann die Zellen nach Bestrahlung in die S-Phase eintraten. Die unterschiedlich großen Blasen in der Darstellung geben an, wie viele Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt die gleiche Zahl an GFP-53BP1-Foci aufwiesen.

4.1.4 Entwicklung des Schadenslevels in der S-Phase nach Bestrahlung in der G1-Phase

Die Beobachtung, dass Zellen nach Bestrahlung den G1/S-Checkpoint mit unreparierten DSBs überwinden konnten, führte zu der Fragestellung, wie sich dies auf das Schadenslevel der Zellen während der Progression durch die S-Phase auswirkt. Zur Aufklärung dieser Frage wurden wiederum einzelne Zellen mittels LCI über den G1/S-Übergang hinweg durch die S-Phase verfolgt und die GFP-53BP1-Foci stündlich quantifiziert. Dabei handelte es sich um dieselben Zellen, die auch schon während der G1-Phase beobachtet wurden.

Bei der Auswertung der S-Phase wurde festgestellt, dass die Länge der S-Phase mit 9 h bis 22 h in den einzelnen Zellen stark variierte. Aus diesem Grund wurde die S-Phase jeder Zelle zunächst in Viertel aufgeteilt und die entsprechenden Foci-Werte wurden gemittelt (Abb. 28).

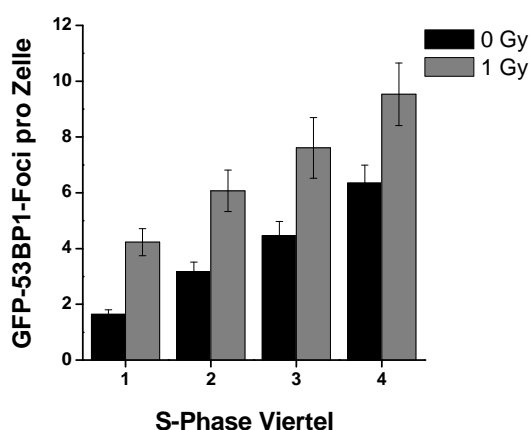


Abb. 28: Entwicklung der Anzahl von DSBs nach Bestrahlung mit 1 Gy im Verlauf der S-Phase

82-6hTert-Zellen wurden mit den Konstrukten GFP-53BP1 und RFP-Ligasel transfiziert und in die Kanäle eines μ -slide VI ausgesät. Die exponentiell wachsenden Zellen wurden 48 h später mit 1 Gy bestrahlt bzw. unbestrahlt belassen und über einen Zeitraum von 24 h im LCI-System mit DL und AL (TxR-Filter, Belichtungszeit 350 ms, 1 Ebene, GFP-Filter, Belichtungszeit 350 ms, 3 Ebenen mit 900 μ m Abstand) aufgenommen. In den Bildern wurden anschließend am Bildschirm die GFP-53BP1-Foci in S-Phase-Zellen gezählt. Für diese Darstellung wurde die Länge der S-Phase jeder einzelnen Zelle in Viertel aufgeteilt und die mittleren Fociwerte errechnet. Durch diese Normierung sollte der stark variierenden Dauer unterschiedlicher S-Phase-Zellen Rechnung getragen werden. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler über die ausgewerteten Zellen an.

In den unbestrahlten Zellen stieg die Anzahl der GFP-53BP1-Foci im Verlauf der S-Phase von 2 Foci im ersten Viertel bis auf 6 Foci pro Zelle im vierten Viertel an. Der Grund für diesen Anstieg ist möglicherweise die Entstehung von replikationsassoziierten Foci während der S-Phase. Um ausschließen zu können, dass diese Foci während der S-Phase durch die Aufnahmen im LCI-System entstanden,

wurden doppelt transfizierte Zellen mit 1 Gy bestrahlt oder unbestrahlt belassen und während der S-Phase entweder stündlich über einen Zeitraum von 7 h oder nur zu Beginn und zum Ende des Versuchs unter LCI-Bedingungen aufgenommen. Am Ende des Versuchs wurden die GFP-53BP1-Foci aller S-Phase-Zellen quantifiziert (Tab. 10). Zwischen stündlich belichteten und nur einmal belichteten Zellen ergab sich kein Unterschied in der Anzahl der Foci der S-Phase.

Tab. 10: Anzahl GFP-53BP1-Foci in der S-Phase

	82-6hTert 0 Gy	82-6hTert 1 Gy
Anzahl Foci belichtet	2,9	8,7
Anzahl Foci unbelichtet	2,0	8,0

Den gleichen Anstieg von GFP-53BP1-Foci durch die S-Phase konnte man auch in bestrahlten Zellen erkennen, allerdings lagen hier die Werte durchschnittlich um 3-4 Foci höher als bei den unbestrahlten Zellen. Zu Beginn der S-Phase lag der Wert über 4 Foci, im zweiten Viertel bei 6 Foci und im dritten Viertel bei fast 8 Foci. Im letzten Viertel waren etwa 9 Foci pro Zelle vorhanden.

Dies könnte darauf hindeuten, dass die DSBs, mit welchen die Zellen den G1/S-Checkpoint überwunden hatten und somit noch aus der G1-Phase stammten, im Laufe der S-Phase nicht repariert wurden und zusätzliche DSBs auftraten, sodass die Focizahl am Ende der S-Phase die Focizahl zu Beginn der S-Phase deutlich übertraf.

Da die Methode des LCI den Vorteil bietet, dass einzelne Zellen verfolgt werden können, wurden in allen verfolgten Zellen zu jeder Stunde die Anzahl der GFP-53BP1-Foci ausgewertet. Die Anzahl der GFP-53BP1-Foci in unbestrahlten Zellen stieg von 0 bis 2 Foci bei Eintritt in die S-Phase bis auf 5 bis 16 Foci in den einzelnen Zellen nach 12 h in der S-Phase an. Nach Bestrahlung in der G1-Phase traten Zellen mit Fociwerten zwischen 2 und 17 Foci in die S-Phase ein. Zellen mit einer höheren Anzahl GFP-53BP1-Foci zeigten eine kurze Reparaturphase bis 4 h, worauf ein Anstieg des Focilevels während der S-Phase von 4 bis auf 25 Foci nach 12 h folgte (Abb. 29 A).

Wegen dieser großen Schwankungen der Focizahlen zwischen den Zellen ließ die Beobachtung der einzelnen Zellen keine eindeutigen Rückschlüsse zwischen der Anzahl der Foci und dem Eintreten der Zellen in die S-Phase nach Bestrahlung in der G1-Phase zu. Aus diesem Grund wurden die Zellen wie in Kapitel 4.1.3 gemäß dem Zeitpunkt ihres Eintretens in die S-Phase gruppiert. Dadurch konnte untersucht werden, ob Unterschiede zwischen der Focianzahl von Zellen bestanden, welche früh oder spät nach Bestrahlung in der G1-Phase in die S-Phase gelangten.

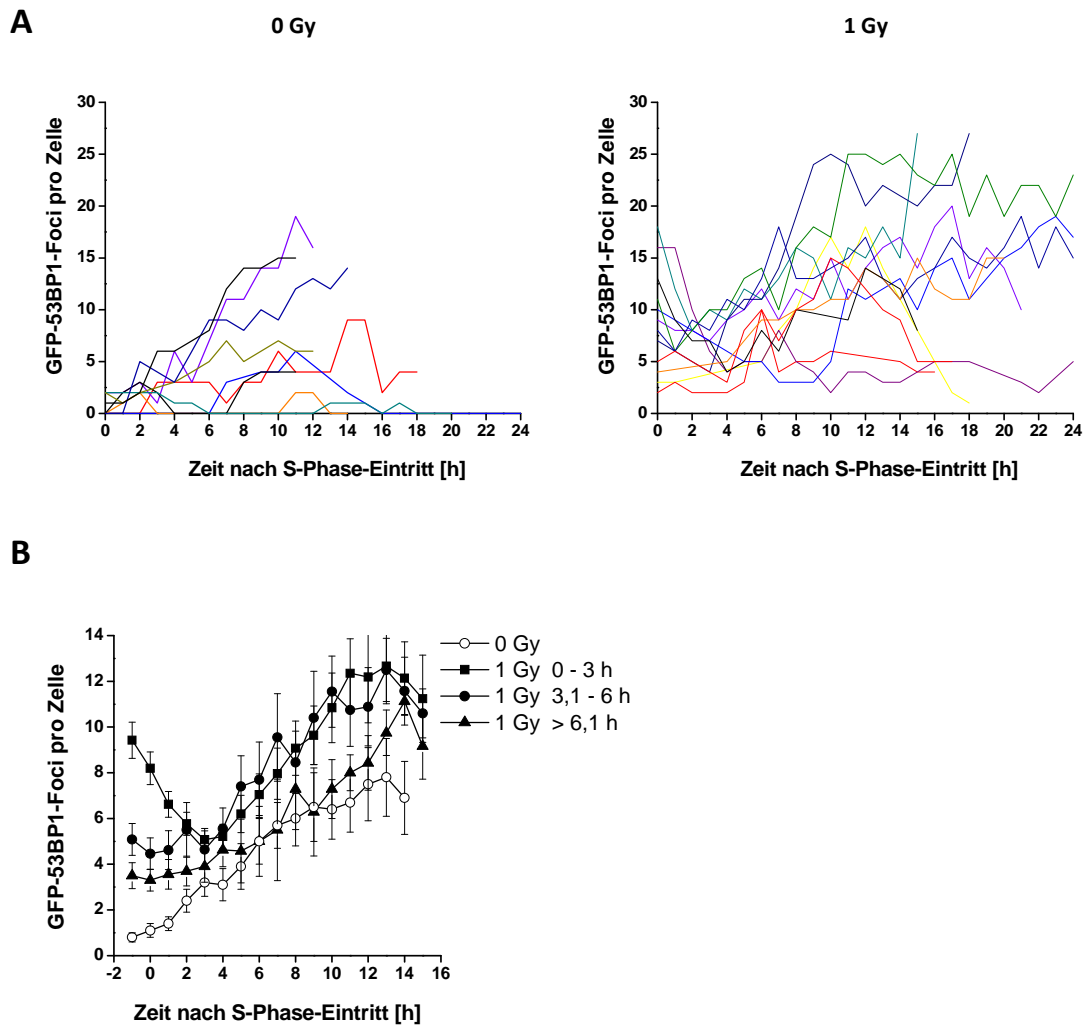


Abb. 29: Verfolgung von GFP-53BP1-Foci durch die S-Phase

(A) Die Anzahl der GFP-53BP1-Foci der bereits in Abb. 28 ausgewerteten unbestrahlten und bestrahlten Zellen wurden zunächst noch einmal ungruppiert während ihrer Progression durch die S-Phase dargestellt.

(B) Zur Auswertung wurde die Anzahl der GFP-53BP1-Foci nach dem Eintritt der Zellen in die S-Phase gruppiert. Die Gruppen zeigen bestrahlte Zellen, die zwischen 0 h und 3 h, zwischen 3,1 h und 6 h und mehr als 6,1 h nach Bestrahlung in die S-Phase eintraten. Die unbestrahlte Probe stellt den Mittelwert aus allen ausgewerteten Zellen dar. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der ausgewerteten Zellen an.

Die Population der unbestrahlten 82-6hTert-Zellen wies zu Beginn der S-Phase durchschnittlich einen GFP-53BP1-Focus pro Zelle auf (Abb. 29 B). Im Verlauf der S-Phase nahm die Anzahl der GFP-53BP1-Foci bis zu einem Wert von 7 Foci pro Zelle kontinuierlich zu, was auf die Entstehung replikationsassoziierter Foci schließen ließ. Die Gruppe der bestrahlten Zellen zeigte in den ersten 3 h der S-Phase drei Tendenzen. In Zellen, die früh nach Bestrahlung in der G1-Phase in die S-Phase gelangten und somit kaum Zeit für Reparatur zur Verfügung hatten, nahm die Anzahl der Foci zunächst von 9 auf 4 ab. Die Focianzahl der Gruppe, welche 3 h später in die S-Phase progressierte, blieb in den ersten 3 h fast gleich und die Gruppe, die nach 6 h in die S-Phase gelangte, zeigte einen leichten Anstieg der Focizahl von 3 auf 4. Ab diesem Zeitpunkt nahm die Anzahl an GFP-53BP1-Foci in allen Gruppen kontinuierlich bis zum Ende der S-Phase zu, wobei sich die Zunahme in allen Gruppen bestrahlter Zellen auf konstant höherem Niveau als bei unbestrahlten Zellen befand. Die Gruppe, welche nach Bestrahlung zuerst in die S-Phase gelangte, zeigte dabei die größte Differenz zu den

unbestrahlten Zellen, die Fociwerte der Gruppe, die nach 3 h in die S-Phase gelangte, lagen nur geringfügig unter denen der ersten Gruppe. Aber auch die Fociwerte der spät in die S-Phase gelaufenen Zellen war im Vergleich zu unbestrahlten Zellen leicht erhöht.

Wie bereits bei Darstellung der S-Phase-Viertel (Abb. 28) zeigte sich auch bei Gruppierung der Zellen nach Eintritt in die S-Phase nach Bestrahlung in der G1-Phase keine Verringerung der IR-induzierten Foci. Dieses Phänomen erweckte den Eindruck, dass in der G1-Phase induzierte DSBs während der S-Phase nicht repariert wurden. Es wäre aber auch möglich, dass sie repariert wurden und in den bestrahlten Zellen mehr replikationsassoziierte Foci entstanden als in unbestrahlten Zellen. Zur Aufklärung der Focientwicklung in bestrahlten Zellen der S-Phase wurden wiederum einzelne Zellen der LCI-Filme verfolgt und die Reparatur und das Auftauchen einzelner GFP-53BP1-Foci beobachtet.

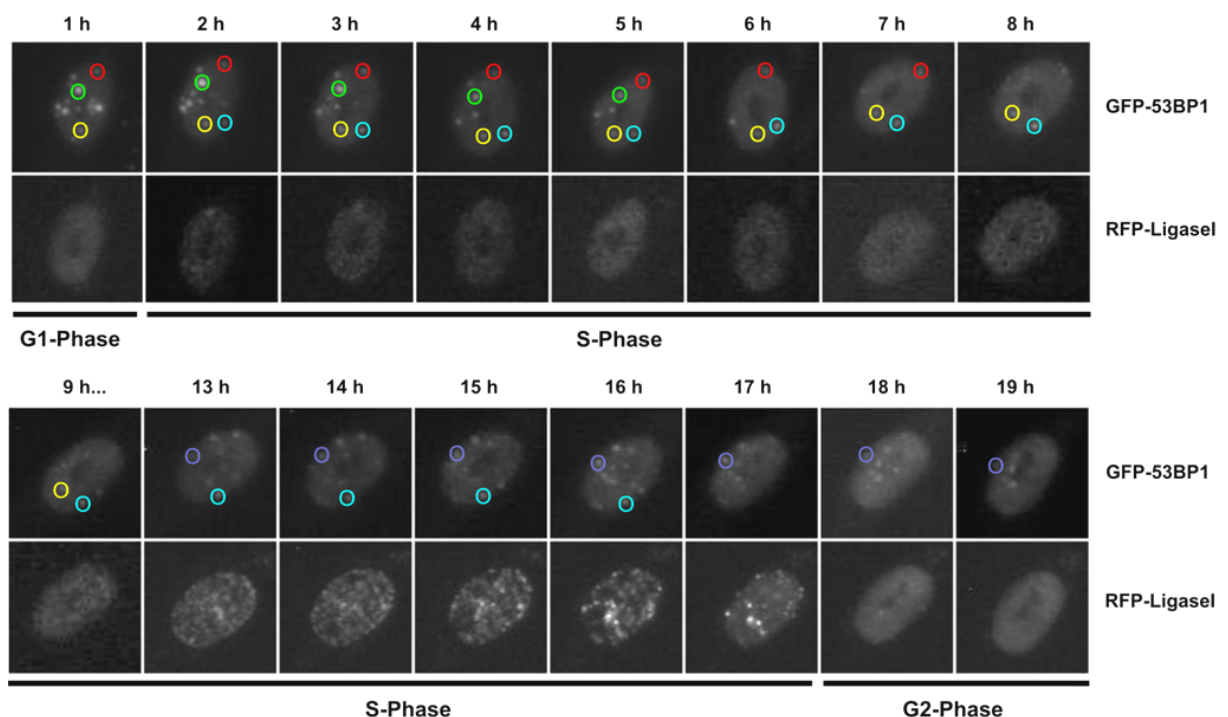


Abb. 30: LCI-Aufnahme der GFP-53BP1-Entwicklung in einer einzelnen bestrahlten Zelle während der S-Phase

82-6hTert-Zellen wurden mit den Konstrukten GFP-53BP1 und RFP-Ligase1 transfiziert und nach Aussaat und Wachstum in einem μ -slide VI mit 1 Gy bestrahlt. Die Zellen wurden im DL und AL aufgenommen, die Belichtungszeit mit GFP- als auch mit TxR-Filter betrug 350 ms, zur Identifikation der GFP-53BP1-Foci wurden 3 Ebenen im Abstand von 900 μ m aufgenommen. Die Bestrahlung der dargestellten Zelle fand in der G1-Phase, 1 h vor Eintritt in die S-Phase, statt. Zur Veranschaulichung des Reparaturverhaltens sind einzelne Foci durch farbige Kreise markiert. Eine Farbe kennzeichnet dabei immer denselben Focus, der durch die Zellzyklus-Phasen verfolgt wird. Exemplarisch sind drei dieser Foci ausgewählt und mit den Farben rot, grün und gelb markiert, um das Reparaturverhalten bei strahleninduzierten Foci während der S-Phase beobachten zu können. Zunächst bleiben die Foci beim Übergang von der G1-Phase in die S-Phase erhalten. Die strahleninduzierten Foci aus der G1-Phase sind bis zum Zeitpunkt 5 h nach Bestrahlung noch in der S-Phase vorhanden. Im Verlauf der folgenden Stunde wird der mit „grün“ markierte Focus repariert und ist verschwunden. Die Reparatur des „rot“ markierten DSBs erfolgt von Stunde 7 auf Stunde 8, die des „gelb“ markierten Focus 9 h nach Bestrahlung. Gleichzeitig wird das Auftauchen neuer Foci beobachtet. Sofort nach Eintritt in die S-Phase, 2 h nach Bestrahlung, kann man diese neuen Foci, hier ein Focus in blau markiert, identifizieren. Zu späteren Zeitpunkten in der S-Phase kommen immer mehr nicht-strahlungsabhängige Foci hinzu, was besonders gut ab Stunde 13 nach Bestrahlung zu erkennen ist, z.B. „violett“ markierter Focus. In den ersten Stunden der S-Phase erfolgt eine Abnahme der in der G1-Phase induzierten Foci, ab 13 h nach Bestrahlung nimmt die Anzahl der Foci in der S-Phase deutlich zu. In der G2-Phase ist wiederum eine Abnahme der Foci zu erkennen.

Im ersten Bild der Darstellung (Abb. 30) war die Induktion der strahleninduzierten GFP-53BP1-Foci in der G1-Phase gut erkennbar. Nach Eintritt der Zelle in die S-Phase wurden die strahleninduzierten Foci repariert. Während der S-Phase entstanden neue Foci an Stellen, wo zuvor kein Focus sichtbar war. Die Reparatur und die Entstehung neuer Foci wurden auf diese Weise in ca. 10 Zellen pro Gruppe ausgewertet (Abb. 31).

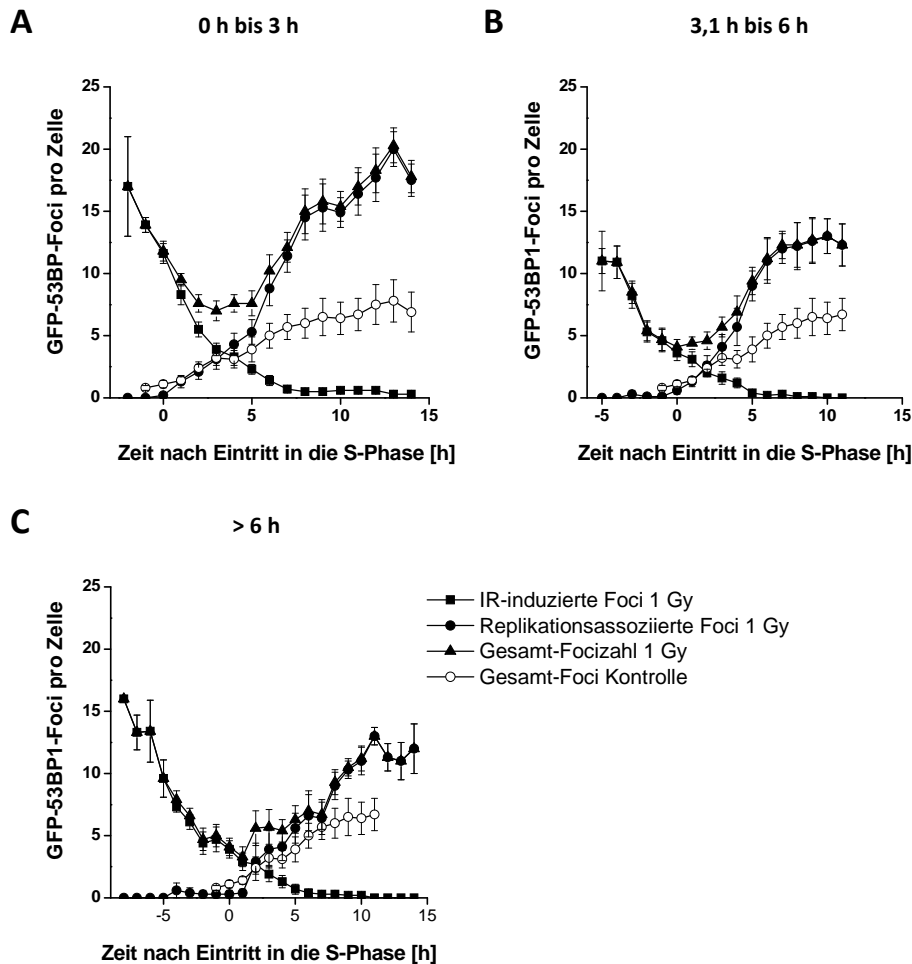


Abb. 31: Zeitliche Entwicklung strahlen- und replikationsassoziierter GFP-53BP1-Foci in der S-Phase

In jeweils 10 Zellen jeder Gruppierung wurde eine getrennte Auswertung strahlen- und replikationsassoziierter Foci vorgenommen. Die Zellen wurden wiederum je nach Zeitpunkt ihres Eintritts in die S-Phase von 0 h bis 3 h (A), von 3,1 h bis 6 h (B) und > 6 h (C) gruppiert. Gezeigt ist die Reparatur der strahleninduzierten Foci in G1- und S-Phase und das Entstehen replikationsassoziierter Foci durch die S-Phase. Zum Vergleich ist die Focientwicklung in nicht bestrahlten Zellen und die kombinierte Anzahl aus strahleninduzierten und replikationsassozierten Foci in jeden Graphen eingefügt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler aller ausgewerteten Zellen.

Direkt nach Bestrahlung mit 1 Gy in der G1-Phase lag die Induktion in allen Gruppen zwischen 11 und 17 Foci. Während der verbleibenden Zeit in der G1-Phase (0 h bis >6 h) bis zum Eintritt der Zellen in die S-Phase wurde ein großer Teil dieser strahleninduzierten Foci repariert. Die strahleninduzierten Foci wurden, nachdem die Zellen in die S-Phase progressiert waren, innerhalb von 5 h bis 8 h vollständig repariert. Ab dem Zeitpunkt des Eintritts in die S-Phase konnte die Entstehung neuer, möglicherweise replikationsassoziierter Foci beobachtet werden, denn die Entstehung neuer Foci wurde auch bei der unbestrahlten Kontrolle beobachtet. Vor Eintritt in die S-Phase lagen die

Fociwerte bei etwa einem Focus pro Zelle, nach Eintritt in die S-Phase stieg der Wert innerhalb von 11 h kontinuierlich bis auf 7 Foci an.

Die Gruppe der Zellen, die zwischen 0 h und 3 h nach Bestrahlung in die S-Phase eintrat, zeigte durchschnittlich den stärksten Zuwachs an replikationsassoziierten Foci, nach 10 h in der S-Phase erreichten die Zellen einen Wert von über 15 Foci pro Zelle. Die Gruppe, die zwischen 3,1 h und 6 h in die S-Phase progressierte, wies nach 10 h in der S-Phase 13 Foci pro Zelle auf, die Gruppe, die nach mehr als 6 h in die S-Phase eintrat, erreichte nach 10 h in der S-Phase einen Wert von 11 Foci. Insgesamt legt diese Auswertung nahe, dass strahleninduzierte Foci vollständig repariert wurden. Die Zunahme des Gesamtfoci-Levels war auf die Entstehung replikationsassoziiierter Foci zurückzuführen. In bestrahlten Zellen war dieser Effekt stärker zu sehen als in unbestrahlten Zellen, wodurch gegen Ende der S-Phase auch deren höheres Foci-Level zustande kam.

Da die Zellen nur stündlich aufgenommen wurden, könnten GFP-53BP1-Foci durch Chromatinbewegungen innerhalb der Zelle aus der Schärfeebene verschwinden und dies fälschlicherweise als Reparatur gewertet werden. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde die Reparatur der strahleninduzierten Foci durch die Zugabe eines DNA-PK-Inhibitors (DNA-PKi) inhibiert (Hollick *et al.*, 2003). Durch die Inhibierung von DNA-PK fehlte somit eine wichtige Komponente in der DNA-DSB-Reparatur. Sollten die Foci auch nach Zugabe des Inhibitors verschwinden, würden die strahleninduzierten Foci nicht repariert, sondern ein technisches Problem bei der Aufnahme bzw. die Chromatinbewegungen innerhalb der Zellen lägen dem Verschwinden zugrunde. 30 min vor Bestrahlung mit 0,5 Gy wurde DNA-PKi zu den Zellen gegeben. In diesem Experiment wurde die Bestrahlungsdosis halbiert, da durch die Inhibierung der Replikation immer mehr Foci in der Zelle akkumulieren. Bei einer höheren Dosis würden sich letztlich zu viele Foci in einer Zelle befinden, um sie auszuwerten.

Nach Bestrahlung der Zellen mit einer Dosis von 0,5 Gy wurden zwischen 4 und 6 Foci induziert (Abb. 32). Im Verlauf des Versuchs konnte keine Verringerung der IR-induzierten Foci beobachtet werden. Dies war selbst dann nicht der Fall, als die Zellen in die S-Phase progressierten. Das Verschwinden der GFP-53BP1-Foci in Zellen ohne DNA-PKi war somit nicht auf das Verschwinden in eine andere Schärfeebene bei der Aufnahme der Zellen zurückzuführen, sondern tatsächlich auf die Reparatur der DSBs.

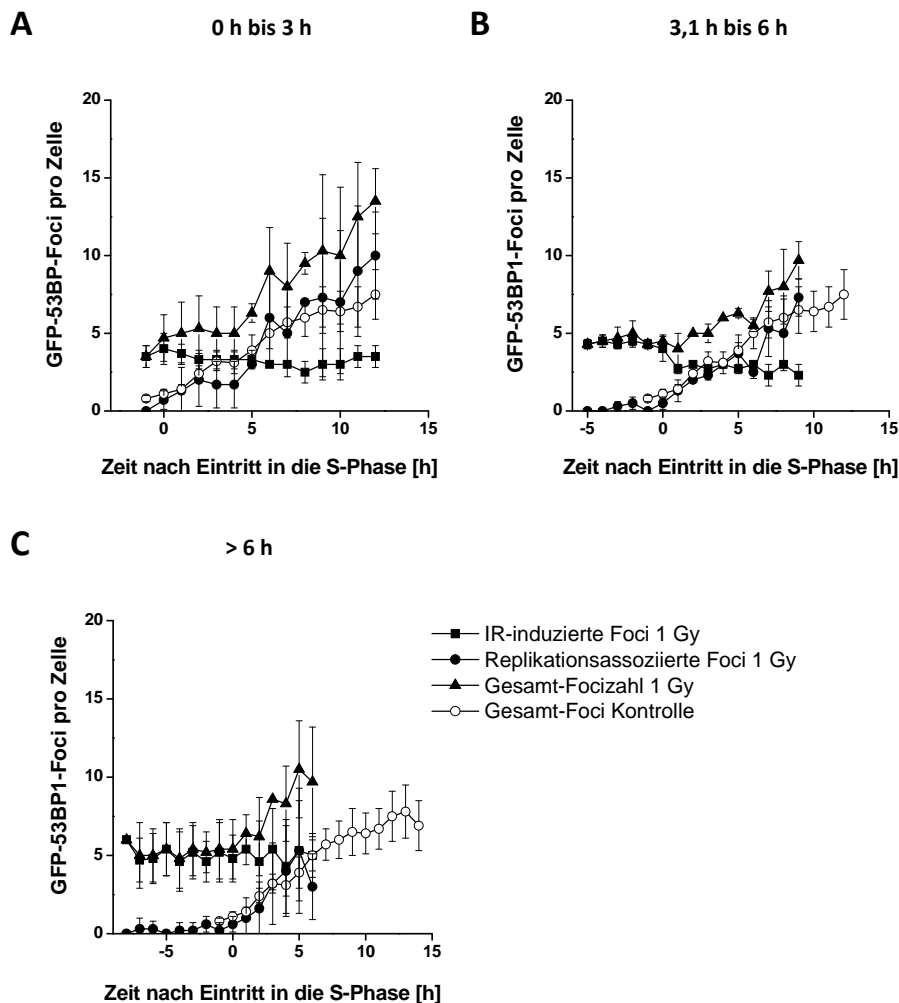


Abb. 32: Zeitliche Entwicklung strahlen- und replikationsassoziierter Foci nach Behandlung mit DNA-PK-Inhibitor

Die Zugabe des DNA-PK-Inhibitors (DNA-PKi) erfolgte 30 min vor Bestrahlung der doppelt transfizierten 82-6hTert-Zellen mit 0,5 Gy und blieb während des gesamten Versuchszeitraums auf den Zellen. Durch die Zugabe des DNA-PKi wurde die Reparatur der strahleninduzierten Foci verhindert. Aus diesem Grund wurde die Bestrahlungsdosis im Gegensatz zu den zuvor durchgeführten Versuchen auf 0,5 Gy halbiert, um durch bestehende, strahleninduzierte und neu hinzukommende, replikationsassoziierte Brüche nicht zu viele Foci im Zellkern zu akkumulieren. In den Zellen wurden anschließend stündlich die strahleninduzierten Foci und die replikationsassoziierten Foci quantifiziert. Wie bei den bisher durchgeführten Versuchen wurden auch hier die Zellen nach Zeitpunkt des Eintritts in die S-Phase nach Bestrahlung in der G1-Phase in die Gruppen 0 h bis 3 h (A), 3,1 h bis 6 h (B) und > 6 h (C) eingeteilt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler aller ausgewerteten Zellen.

Durch die Versuche mit lebenden Zellen im LCI-System konnte ein langsam einsetzender G1/S-Checkpoint nach Bestrahlung beobachtet werden. Zusätzlich wurde das Schadenslevel über GFP-53BP1 direkt in Zellen am G1/S-Übergang bestimmt. Unmittelbar nach Bestrahlung gelangten Zellen mit einer hohen Anzahl an DSBs in die S-Phase und selbst wenn der G1/S-Checkpoint voll eingesetzt hatte, überwand ihn einige Zellen mit einem immer noch erhöhten Foci-Level. Durch die weitere Verfolgung einzelner Zellen durch die S-Phase wurde deutlich, dass neben strahleninduzierten Foci, die im Laufe der S-Phase repariert wurden, replikationsassoziierte Foci in der S-Phase entstanden.

4.2 Charakterisierung des G1/S-Checkpoints mittels Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Bisherige Untersuchungen dieser Arbeit zur Analyse des G1/S-Checkpoints und des Zellzyklus-Verhaltens wurden in lebenden Zellen mit der Methode des *Live Cell Imagings* durchgeführt. Diese Methode erlaubte eine Analyse auf Einzelzellebene und die Verfolgung von Zellen über lange Zeiträume in kurzen Intervallen. Die bisher erhaltenen Ergebnisse zum Einsetzen des G1/S-Checkpoints deuten einen langsam einsetzenden Checkpoint an, der in den ersten Stunden nach Bestrahlung von Zellen mit einer großen Anzahl von DSBs überwunden wird. Um diese Ergebnisse zu überprüfen und zu verifizieren, wurden bereits etablierte, klassische Methoden zur Untersuchung des G1/S-Checkpoints verwendet. In diesem Fall wurden durchflusszytometrische Analysen sowie Immunfluoreszenz-Mikroskopie durchgeführt. Die Methode der Durchflusszytometrie bietet den Vorteil eines hohen Probendurchsatzes und der gleichzeitigen Messung verschiedener physikalischer Parameter der Zellen wie Größe, Granularität und DNA-Gehalt. Über Immunfluoreszenz-Mikroskopie können gleichzeitig unterschiedliche Proteine und deren Lokalisation über Antikörperfärbungen nachgewiesen werden. Diese Methode erlaubt ebenfalls eine Analyse auf Einzelzellebene. Der Nachteil dieser Methoden ist jedoch, dass zu jedem neuen Reparatur- oder Mess-Zeitpunkt eine andere Population von Zellen ausgewertet wird und es nicht möglich ist, einzelne Zellen lückenlos über mehrere Stunden bis Tage zu verfolgen.

4.2.1 G1/S-Checkpoint-Messung nach IR mittels Durchflusszytometrie

Zunächst wurde die Wirkung ionisierender Strahlung auf das Einsetzen und die Aufrechterhaltung des G1/S-Checkpoints mittels Durchflusszytometrie untersucht. Mit dem hier verwendeten Ansatz konnte die Progression bestrahlter G1-Phase-Zellen im Vergleich zu unbestrahlten G1-Phase-Zellen in die S-Phase ermittelt werden. Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung schon in der S-Phase befanden, wurden markiert und bei der späteren Auswertung ausgeschlossen. Ausgewertet wurde schließlich der Anteil unmarkierter Zellen, die in die S-Phase gelangten.

Die Experimente wurden zuerst mit 82-6hTert WT-Zellen zum direkten Vergleich mit den Ergebnissen des LCI durchgeführt. Zusätzlich wurden die Aspekte des G1/S-Übergangs in den XLF-defizienten 2BNhTert-Zellen mit einem Defekt im NHEJ (*Nicht-Homologes End-Joining*)-Reparaturweg und bei der V(D)J-Rekombination untersucht (Dai *et al.*, 2003). Cernunnos/XLF ist ein Kern-Faktor im NHEJ und Defekte äußern sich bei Patienten in neuronalen Funktionsstörungen, Immundefizienzen und erhöhter Radiosensitivität. Cernunnos/XLF interagiert bei der Induktion von DSBs mit dem XRCC4/DNA Ligase IV-Komplex und aktiviert diesen. Der Komplex ist für den abschließenden Ligationsschritt im NHEJ verantwortlich (Yano *et al.*, 2009). Mit der Verwendung dieser Zelllinie sollte erreicht werden, dass DSBs nach Bestrahlung nicht bzw. sehr langsam repariert werden und ein hohes Schadenslevel über einen langen Zeitraum aufrecht erhalten bleibt. Somit konnten Aussagen über das Aufheben des G1/S-Checkpoints mit einem hohen Schadenslevel im Vergleich zu einem eher niedrigen Schadenslevel in Reparatur-profizienten 82-6hTert-Zellen getroffen werden.

Für die Betrachtung des Zellzyklusverhaltens mittels Durchflusszytometrie wurden exponentiell wachsende Zellen zunächst 1 h mit 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) pulsmarkiert. BrdU ist ein Thymidinanalogon und wird während der Replikation statt des Thymidins in die DNA eingebaut. Nach Detektion des BrdUs mit spezifischen Antikörpern in fixierten Zellen konnten Zellen identifiziert werden, die sich zum Zeitpunkt der Markierung in der Replikationsphase (S-Phase) des Zellzyklus befanden. Das BrdU wurde nach der Inkubationszeit von den Zellen gewaschen und frisches Medium zugegeben. Die Zellen wurden anschließend mit 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy und 5 Gy bestrahlt und zu jeder Probe eine unbestrahlte Kontrolle mitgeführt. Nach Bestrahlung wurde Nocodazol zu den Zellen gegeben. Nocodazol hemmt den Aufbau der Mikrotubuli und somit die Ausbildung des Spindelapparates, wodurch die Zellen in der Mitose arretiert werden. Auf diese Weise sollte verhindert werden, dass nach längeren Reparaturzeiten in der G2-Phase bestrahlte Zellen über die Mitose in die G1-Phase gelangen und sich mit den in der G1-Phase bestrahlten Zellen mischen. Nach Reparaturzeiten von 2 h bis 16 h wurden bestrahlte und unbestrahlte Proben in Intervallen von 2 h fixiert und mittels BrdU-Antikörper zur Identifizierung der BrdU-positiven S-Phase-Zellen und Propidiumiodid (PI) zur Differenzierung der einzelnen Phasen des Zellzyklus gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer vermessen.

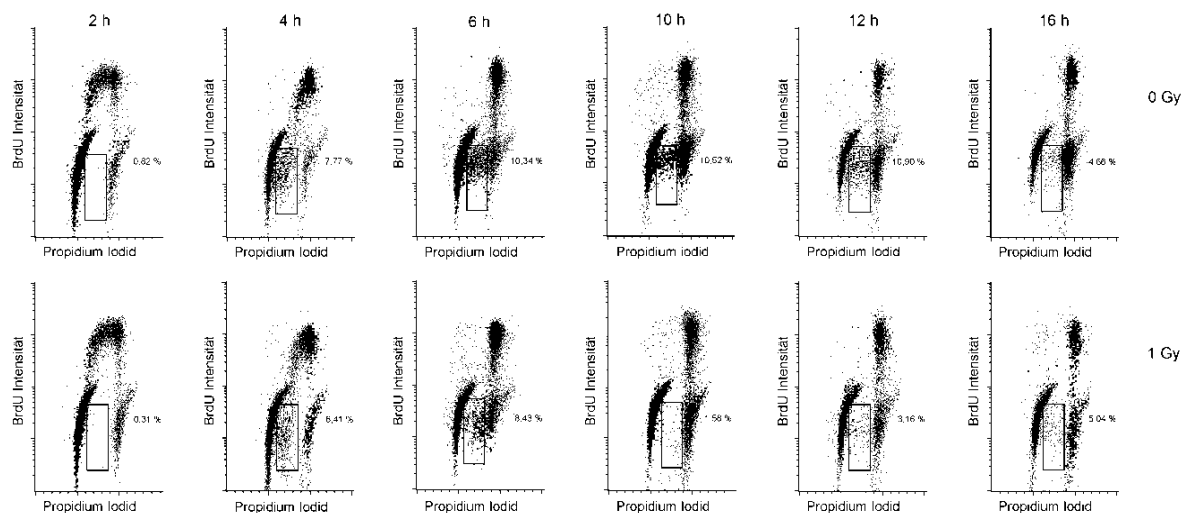


Abb. 33: Repräsentative DotPlots von BrdU-markierten 82-6hTert-Zellen

Für die Durchführung einer durchflusszytometrischen Analyse mit BrdU zur Untersuchung des G1/S-Checkpoints wurde zunächst eine asynchron wachsende Zellpopulation 1 h mit BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin) pulsmarkiert. Das BrdU wurde von sich in der S-Phase befindlichen Zellen eingebaut. Diese Zellen wurden bei der späteren Analyse ausgegrenzt. Von Interesse waren die BrdU-negativen S-Phase-Zellen, deren Progression durch den Zellzyklus in den *DotPlots* dargestellt ist (siehe Rechtecke).

Die *DotPlots* stellen exemplarisch die Population von fixierten 82-6hTert-Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten dar, wobei jeder Punkt einer fixierten Zelle entspricht. Der DNA-Gehalt der Zellen ist auf der Abszisse linear aufgetragen. G1-Zellen besitzen einen einfachen DNA-Gehalt (2n), G2-Zellen einen doppelten DNA-Gehalt (4n). Die Ordinate zeigt in logarithmischer Skalierung die BrdU-Intensität der Zellen. Je höher die Zellen im Diagramm liegen, desto höher ist ihr Gehalt an eingebautem BrdU. Das eingezeichnete Rechteck in den *DotPlots* zeigt die Population BrdU-negativer S-Phase-Zellen an, die Zahl rechts neben dem Rechteck gibt die Prozentzahl der BrdU-negativen S-Phase-Zellen an der gesamten Zellpopulation an. Die Population links der BrdU-negativen S-Phase-Zellen stellt die BrdU-negativen G1-Phase-Zellen dar, die Population rechts davon die BrdU-negativen G2-Phase-Zellen. Oberhalb der BrdU-negativen S-Phase-Zellen befinden sich die BrdU-positiven S-Phase-Zellen.

2 h nach Bestrahlung bzw. mock-Behandlung (keine Bestrahlung) waren nur BrdU-positive S-Phase-Zellen, welche als Bogen über den BrdU-negativen G1- und G2-Phase-Zellen lagen, zu erkennen (Abb. 33). Diese BrdU-positive Population progressierte bei bestrahlten als auch unbestrahlten Zellen in die G2-Phase und akkumulierte dort aufgrund der Zugabe von Nocodazol. Nach 2 h waren noch keine BrdU-negativen S-Phase-Zellen vorhanden, erst nach 4 h hatten sie genügend DNA repliziert, um sich deutlich von der G1-Phase abzusetzen. Nach Reparaturzeiten von 6 h, 10 h und 12 h war das Fenster der BrdU-negativen S-Phase-Zellen gefüllt, die Zellen progressierten gleichmäßig von der G1- durch die S- in die G2-Phase. Nach 16 h nahm der Anteil der S-Phase-Zellen ab, da aktiv proliferierende Zellen durch Nocodazol am Durchlaufen eines weiteren Zellzyklus gehindert wurden. Die weiterhin sichtbare Population mit einfachem DNA-Gehalt bestand aus G0-Zellen, die nicht proliferierten. Bei bestrahlten Zellen war bis zum Zeitpunkt 4 h noch kein wesentlicher Unterschied zu der unbestrahlten Probe zu erkennen. Ab 6 h nach Behandlung wurde deutlich, dass die Population BrdU-negativer S-Phase-Zellen in der bestrahlten Probe im Gegensatz zur unbestrahlten Probe erst langsam, ab 10 h deutlich abnahm. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Zellen am G1/S-Checkpoint festgehalten wurden und nicht mehr in die S-Phase eintreten konnten. Zusätzlich progressierten Zellen, die sich noch in der S-Phase befunden hatten, weiter in die G2-Phase, wodurch sich nach 10 h kaum Zellen im Fenster der BrdU-negativen S-Phase Population befanden. Nach 12 h bzw. 16 h waren wieder vereinzelt BrdU-negative S-Phase-Zellen bei den bestrahlten Proben zu erkennen. Dies könnte auf ein Aufheben des G1/S-Checkpoints hindeuten.

Zur Messung des G1/S-Checkpoints wurde der Anteil der BrdU-negativen Zellen von 82-6hTert und 2BNhTert nach IR zu verschiedenen Zeiten bestimmt. In der unbestrahlten Kontrolle stieg der Anteil der BrdU-negativen S-Phase-Zellen an der Gesamtpopulation von 82-6hTert bis zum Zeitpunkt 6 h kontinuierlich bis auf etwa 12 % an (Abb. 34). Die Prozentwerte zu den Zeitpunkten 8 h bis 14 h lagen konstant zwischen 10 % und 12 % BrdU-negativer S-Phase-Zellen. Nachdem die unmarkierten Zellen in den ersten Stunden in die S-Phase eingetreten waren, stellte sich zu späteren Zeitpunkten ein Gleichgewicht zwischen Zellen, welche in die S-Phase eintraten, und Zellen, die sie wieder verließen, ein. Bei 16 h nahm die Anzahl der Zellen in dieser Population ab. Der Rückgang der BrdU-negativen S-Phase-Zellen zum Zeitpunkt 16 h kam dadurch zustande, dass die Zellen durch Nocodazol am Ende der G2-Phase arretiert wurden, sie nicht mehr in die G1-Phase gelangten und weiter in die S-Phase progressieren konnten. Bei den mit 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy und 5 Gy bestrahlten Proben ähnelte der Verlauf des S-Phase-Eintritts der Zellen zunächst dem der unbestrahlten Proben. Mit steigender Dosis konnte innerhalb der ersten 6 h nach Bestrahlung lediglich eine leichte Verlangsamung des S-Phase-Eintritts festgestellt werden, zum Zeitpunkt 6 h lagen die Proben zwischen 1 % (1 Gy) und 4 % (5 Gy) niedriger als unbestrahlte Proben. Bei Reparaturzeiten länger als 6 h nahm die Anzahl der BrdU-negativen S-Phase-Zellen bei allen bestrahlten Proben ab. Zum Zeitpunkt 8 h lag der Anteil der BrdU-negativen S-Phase-Zellen bei der mit 5 Gy bestrahlten Probe bei 2,5 %, bei der mit 0,5 Gy bestrahlten Probe bei 4,4 %. Die Abnahme der bestrahlten Zellen nach 6 h zeigte, dass die Zellen durch den einsetzenden G1/S-Checkpoint nicht mehr in die S-Phase eintreten konnten, während die sich bereits in der S-Phase befindlichen Zellen weiter in die G2-Phase progressierten. Die Höhe der Bestrahlungsdosis schien dabei keinen Einfluss auf den Zeitpunkt des

Einsetzens des Checkpoints zu haben. Durch den erneuten Anstieg der BrdU-negativen S-Phase-Zellen nach unterschiedlichen Zeiten wurde das Aufheben des G1/S-Checkpoints angezeigt. Allerdings schien sich die Dauer des G1-Arrestes mit der Dosis zu erhöhen.

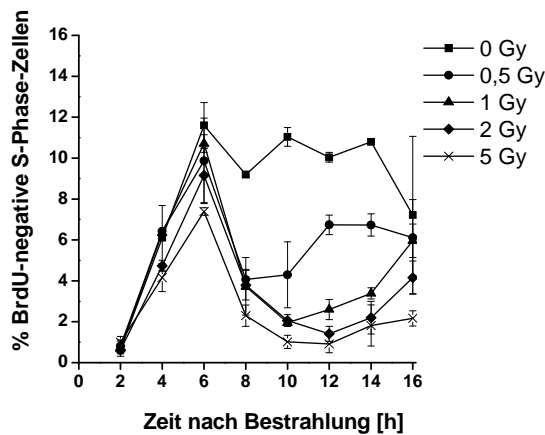
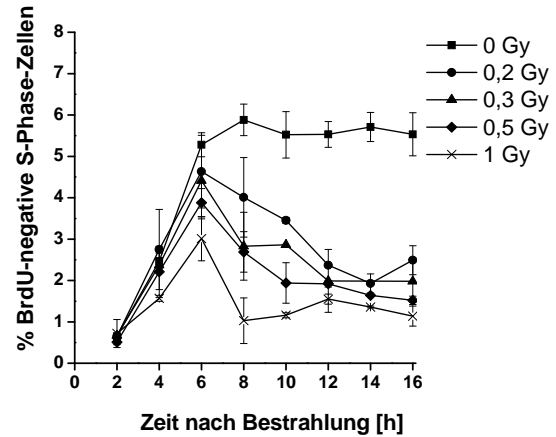
A**B**

Abb. 34: Durchflusszytometrische Quantifizierung BrdU-negativer S-Phase-Zellen nach IR

Exponentiell wachsende 82-6hTert WT-Zellen (A) und 2BNhTert-Zellen (XLF^{-/-}) (B) wurden 1 h mit BrdU pulsmarkiert. Anschließend wurden die 82-6hTert-Zellen mit 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy oder 5 Gy bestrahlt bzw. unbestrahlt belassen und Nocodazol zugegeben. Die 2BNhTert-Zellen wurden mit 0,2 Gy, 0,3 Gy, 0,5 Gy und 1 Gy bestrahlt oder ebenfalls unbestrahlt belassen und Nocodazol zugegeben. Nach Reparaturzeiten von 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 14 h und 16 h wurden die Zellen fixiert und der Anteil der BrdU-negativen S-Phase-Zellen an der gesamten Zellpopulation durchflusszytometrisch bestimmt. Die BrdU-negativen S-Phase-Zellen repräsentieren die Population an Zellen, welche nach Bestrahlung von der G1-Phase in die S-Phase eintrat. Aufgetragen wurde der prozentuale Anteil der BrdU-negativen S-Phase-Zellen an der Gesamtpopulation gegen die Zeit nach Bestrahlung. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler von 4 bis 6 unabhängigen Experimenten an.

2BNhTert-Zellen wurden als Ergänzung zu den Ergebnissen mit 82-6hTert-Zellen eingeführt. Durch die schnelle Reparatur in 82-6hTert-Zellen könnten die Ergebnisse verfälscht werden, wogegen bei 2BNhTert die Schäden länger unrepariert verbleiben. Dadurch sollten sich Effekte, die abhängig von der Anzahl der DSBs sind, stärker manifestieren.

Bei Auswertung der 2BNhTert-Zellen sind die Defekte in der Reparatur von DSBs schon kurz nach der Bestrahlung erkennbar (Beucher *et al.*, 2009), dennoch zeigten sie wie auch die 82-6hTert-Zellen während der ersten 6 h nach Bestrahlung einen stetigen Anstieg der BrdU-negativen S-Phase-Zellen. Aufgrund einer geringeren Proliferationsrate waren die Anteile der in die S-Phase eintretenden Zellen geringer als bei 82-6hTert-Zellen. Die Bestrahlung führte lediglich zu einer Verlangsamung des S-Phase-Eintritts, allerdings bei zunehmender Bestrahlungsdosis stärker ausgeprägt als bei 82-6hTert-Zellen. Auch hier zeigte sich nach 6 h Reparaturzeit ein Maximum BrdU-negativer S-Phase-Zellen. Ihr Anteil lag bei mit 0,2 Gy bestrahlten Zellen bei 4,6 % und bei mit 1 Gy bestrahlten Zellen bei 3,0 %. Unbestrahlte Zellen lagen zu diesem Zeitpunkt bei 5,3 %. Zudem wurden 2BNhTert-Zellen mit geringeren Dosen von 0,2 Gy bis 1 Gy bestrahlt, da diese aufgrund des Reparaturdefektes empfindlicher auf Bestrahlung reagieren. Das Herauslaufen aus der S-Phase und die Aufhebung des G1-Arrests bei bestrahlten Zellen dauerten länger und waren weniger stark ausgeprägt als bei 82-6hTert-Zellen. Ein erneutes Eintreten der Zellen in die S-Phase war außer bei der geringsten Dosis von 0,2 Gy innerhalb des Experimentzeitraums nicht erkennbar. Diese Beobachtungen könnten auf

den Reparaturdefekt von 2BNhTert zurückzuführen sein. Die Zellen reparierten DSBs nicht so effizient wie 82-6hTert-Zellen, es zeigte sich ein höheres Schadenslevel, wodurch die Zellen vermutlich länger am G1/S-Checkpoint arretierten bzw. langsamer durch die S-Phase proliferierten.

Diese Experimente zeigten nach Bestrahlung zunächst nur eine dosisabhängige Verlangsamung des S-Phase-Eintritts der Zellen und ein Einsetzen des G1/S-Checkpoints nach 6 h, unabhängig von der Höhe der Bestrahlung. Zudem gab es erste Hinweise, dass die Dauer der Aufrechterhaltung von der Dosis abhängt. Über den Reparaturdefekt der XLF-defizienten Zellen konnte gezeigt werden, dass die zeitliche Regulation des Einsetzens des G1/S-Checkpoints anscheinend unabhängig vom Schadenslevel der Zellen stattfand.

4.2.2 G1/S-Checkpoint-Messung mittels PCNA in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Bei der Durchflusszytometrie wurde die S-Phase über den DNA-Gehalt definiert. Die Zellen mussten genügend DNA synthetisieren, um sich signifikant von der G1-Phase abzusetzen. Dadurch ergab sich zu Beginn der Messung eine *lag*-Phase von 2 h. Um diese *lag*-Phase zu umgehen, sollte ein S-Phase-Marker verwendet werden, der unabhängig von der Synthese eines Teils der DNA ist und direkt S-Phase-Zellen in einer exponentiell wachsenden Kultur markiert. Dies gelang über die Immunfluoreszenz-Färbung mit PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*). Das ringförmige Protein umgibt die DNA während der DNA-Replikation, dient als „loading Plattform“ für Proteine der DNA-Synthese und verhindert deren Dissoziation vom DNA-Strang. Die Replikation von zunächst Euchromatin und schließlich Heterochromatin führt zu einer spezifischen Musterbildung im Verlauf der S-Phase, welche von den übrigen Phasen des Zellzyklus zu unterscheiden ist (Leonhardt *et al.*, 2000, Rottach *et al.*, 2008). Zur Überprüfung von PCNA als S-Phase-Marker wurde eine Doppelfärbung mit BrdU durchgeführt (Abb. 35). Exponentiell wachsende 82-6hTert-Zellen wurden hierfür 15 min mit BrdU pulsmarkiert, anschließend fixiert und über eine Immunfluoreszenz-Färbung gegen PCNA und BrdU gefärbt. Bei Auswertung der Färbung zeigte sich, dass BrdU und PCNA kolokalisierten, was bestätigte, dass PCNA an Orten der Replikation lokalisiert ist. Weiterhin zeigten beide Marker ein charakteristisches Muster in der S-Phase, welches in Zellen anderer Zellzyklus-Phasen nicht vorhanden war. Das Muster von PCNA und DNA-Ligasel, welches im LCI-Ansatz verwendet wurde, weist während der S-Phase große Ähnlichkeit auf. Der Grund besteht in der End-Joining-Aktivität von DNA-Ligasel, die durch die Interaktion mit PCNA über eine N-terminale PCNA-bindende Domäne gegen DNA-Replikationsstellen gerichtet ist (Montecucco *et al.*, 1995, Cardoso *et al.*, 1997).

Zur Untersuchung des G1/S-Checkpoints mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden exponentiell auf Deckgläschen wachsende 82-6hTert-Zellen bestrahlt oder zur Kontrolle unbestrahlt belassen. Danach wurde Nocodazol zur Arretierung der Zellen in der Mitose zugegeben. Zum Vergleich mit der durchflusszytometrischen Analyse wurden auch hier die Bestrahlungsdosen 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy und 5 Gy, ebenso wie die Fixierungszeitpunkte 2 h bis 16 h in Intervallen von 2 h gewählt. Nach der Fixierung wurden die Zellen gegen das Protein PCNA gefärbt (Abb. 35).

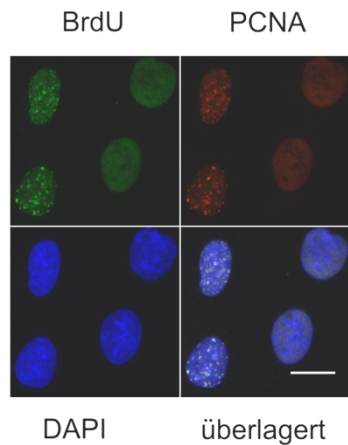


Abb. 35: Kolokalisation von BrdU und PCNA

Zur Überprüfung des S-Phase-Markers PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit BrdU vorgenommen. Exponentiell wachsende 82-6hTert-Zellen wurden für 15 min mit BrdU pulsmarkiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert und es erfolgte eine Immunfluoreszenz-Färbung von PCNA (rot) und BrdU (grün). Zudem wurde eine unspezifische Kernfärbung mit DAPI (blau) vorgenommen. Die Aufnahme erfolgte bei 630-facher Vergrößerung. Eine Kolokalisation zwischen PCNA und BrdU war erkennbar, zudem wiesen nur S-Phase-Zellen ein BrdU-Muster auf, welches dem PCNA-Muster der S-Phase entsprach (Maßstab = 10 µm).

Anschließend wurde der prozentuale Anteil der PCNA-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl gegen die Zeit nach Bestrahlung quantifiziert (Abb. 36). Der Ausgangswert bei bestrahlten und unbestrahlten Proben lag zwischen 14 % und 16 % PCNA-positive Zellen. Hierin zeigt sich ein Unterschied zur Durchflusszytometrie zum Zeitpunkt 0 h, denn bei der Quantifizierung der PCNA-positiven Zellen wurden alle S-Phase-Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten berücksichtigt und es wurde keine Population durch vorherige Markierung wie bei der Durchflusszytometrie ausgeschlossen. Dieser Ausgangswert blieb bei der unbestrahlten Kontrolle über 16 h konstant, da ein gleichmäßiges Ein- und Austreten von G1-Phase-Zellen in die S-Phase bzw. von der S-Phase in die G2-Phase stattfand. Die bestrahlten Proben zeigten ab einer Reparaturzeit von 6 h eine Abnahme der S-Phase-Zellen, was auf das Einsetzen des G1/S-Checkpoints hindeutete. 10 h nach Bestrahlung lag der S-Phase-Anteil der mit 2 Gy und 5 Gy bestrahlten Zellen bei etwa 2 %, der Anteil der mit 0,5 Gy und 1 Gy bestrahlten Zellen bei etwa 5 %. Nach 12 h bei 0,5 Gy, 1 Gy und 2 Gy bzw. nach 14 h bei Bestrahlung mit 5 Gy nahm die Population der S-Phase-Zellen wieder zu, wobei der Anteil der in die S-Phase eintretenden Zellen mit steigender Dosis abnahm.

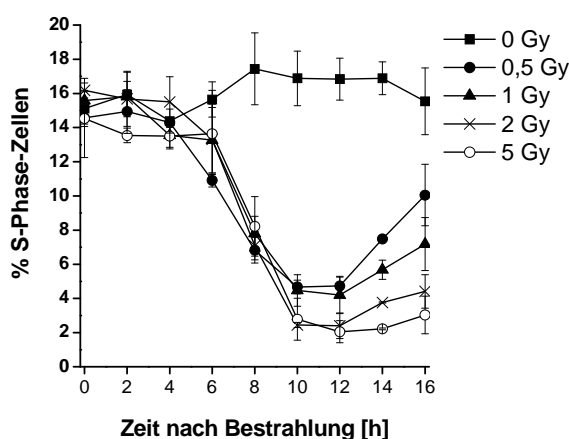


Abb. 36: Quantifizierung von S-Phase-Zellen anhand des PCNA-Musters

Exponentiell wachsende 82-6hTert-Zellen wurden mit 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy oder 5 Gy bestrahlt, anschließend wurde Nocodazol zugegeben. Nach 0 h bis 16 h Reparaturzeit wurden die Zellen fixiert und eine Immunfluoreszenz-Färbung gegen PCNA als S-Phase-Marker durchgeführt. Anschließend wurde der Anteil der PCNA-positiven S-Phase-Zellen an der gesamten Zellpopulation bestimmt und im Diagramm aufgetragen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler der Messungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Die bestrahlten Proben zeigten einen Rückgang des Eintritts von G1-Phase-Zellen in die S-Phase ab dem Zeitpunkt 6 h nach Bestrahlung, was auf das Einsetzen des G1/S-Checkpoints zurückzuführen war. Das Aufheben des G1-Arrests fand 12-14 h nach Bestrahlung statt. Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Daten, die mittels Durchflusszytometrie gewonnen wurden (Kapitel 4.2.1).

Eine Stärke der Immunfluoreszenz-Färbung gegen PCNA besteht in der Möglichkeit, aufgrund des sich im Laufe der S-Phase ändernden PCNA-Musters zwischen frühen, mittleren und späten S-Phase-Zellen zu unterscheiden (Abb. 37). Da zunächst Chromosomen mit weniger stark kondensiertem Euchromatin, welches sich in der Mitte des Zellkerns befindet, repliziert werden, ist die frühe S-Phase durch kleine, über den gesamten Zellkern verteilte Replikationsfoci gekennzeichnet. Das stärker kondensierte Heterochromatin wird während der mittleren S-Phase repliziert. Es ist vorwiegend am Rand des Zellkerns und um die Nucleoli zu finden. Auch in der späten S-Phase wird Heterochromatin repliziert. Die klare Verteilung von randständigen und Nucleoli-assoziierten Foci löst sich allerdings auf, und große Replikationsfoci sind über den gesamten Zellkern verteilt zu finden (Rottach *et al.*, 2008).

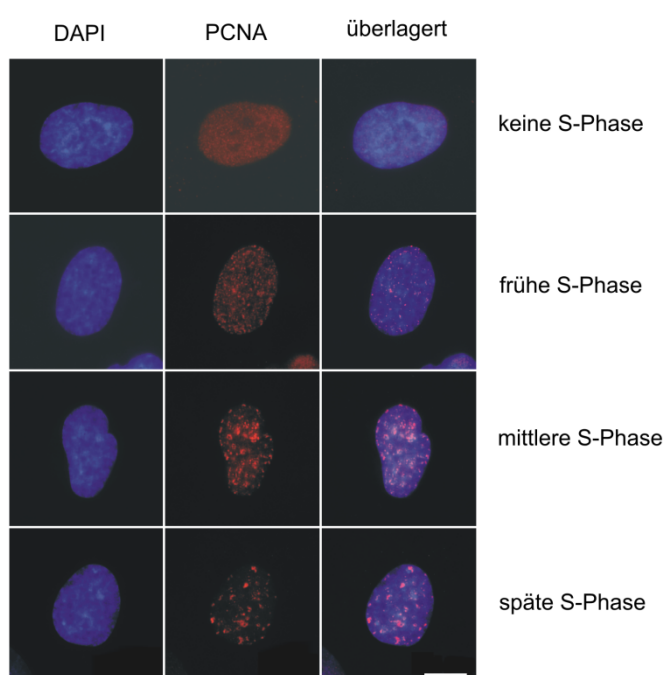


Abb. 37: Darstellung des PCNA-Musters nach Immunfluoreszenz-Färbung in verschiedenen Abschnitten der S-Phase

Die Unterscheidung von früher, mittlerer und später S-Phase war durch Färbung mit einem Antikörper gegen das Protein PCNA möglich. Exponentiell wachsende 82-6hTert-Zellen wurden fixiert und es erfolgte eine Immunfluoreszenz-Färbung gegen PCNA (rot) und eine unspezifische Kernfärbung mit DAPI (blau). In Zellen außerhalb der S-Phase lag das Protein im gesamten Zellkern verteilt vor. Während der frühen S-Phase akkumulierte PCNA an Orten der DNA-Replikation. Durch Replikation des gesamten Genoms im Verlauf der S-Phase änderte sich das Muster der PCNA-Verteilung. Die mittlere S-Phase war gekennzeichnet durch Verlagerung der Replikationsfoci an den Rand des Zellkerns und um die Nucleoli. Während der späten S-Phase fanden sich große PCNA-Foci, die über den gesamten Zellkern verteilt waren (Maßstab = 10 μm).

Die Klassifizierung der in Abb. 38 ausgewerteten S-Phase-Zellen in frühe, mittlere und späte S-Phase zeigte keine wesentliche Veränderung an der Zusammensetzung der S-Phase über einen Zeitraum von 16 h. Frühe S-Phase-Zellen hatten einen Anteil von knapp 9 %, mittlere von etwa 6 % und späte von 2 % an der gesamten S-Phase-Population. Während die Gesamtpopulation der S-Phase-Zellen 6 h nach Bestrahlung abnahm, war eine Verringerung der frühen S-Phase-Zellen interessanterweise bereits 4 h nach Bestrahlung zu erkennen. Eine signifikante Verringerung der mittleren S-Phase ergab sich nach 8 h, der späten S-Phase nach ca. 10 h. Dies spiegelt die Progression durch die S-Phase und die verzögerte Auswirkung des G1/S-Checkpoints auf spätere Zellzyklus-Phasen wider. Danach erfolgte eine erneute Zunahme der Population, was sich vor allem in einer Zunahme der frühen S-Phase-Zellen zeigte, welche den G1/S-Checkpoint überwunden hatten.

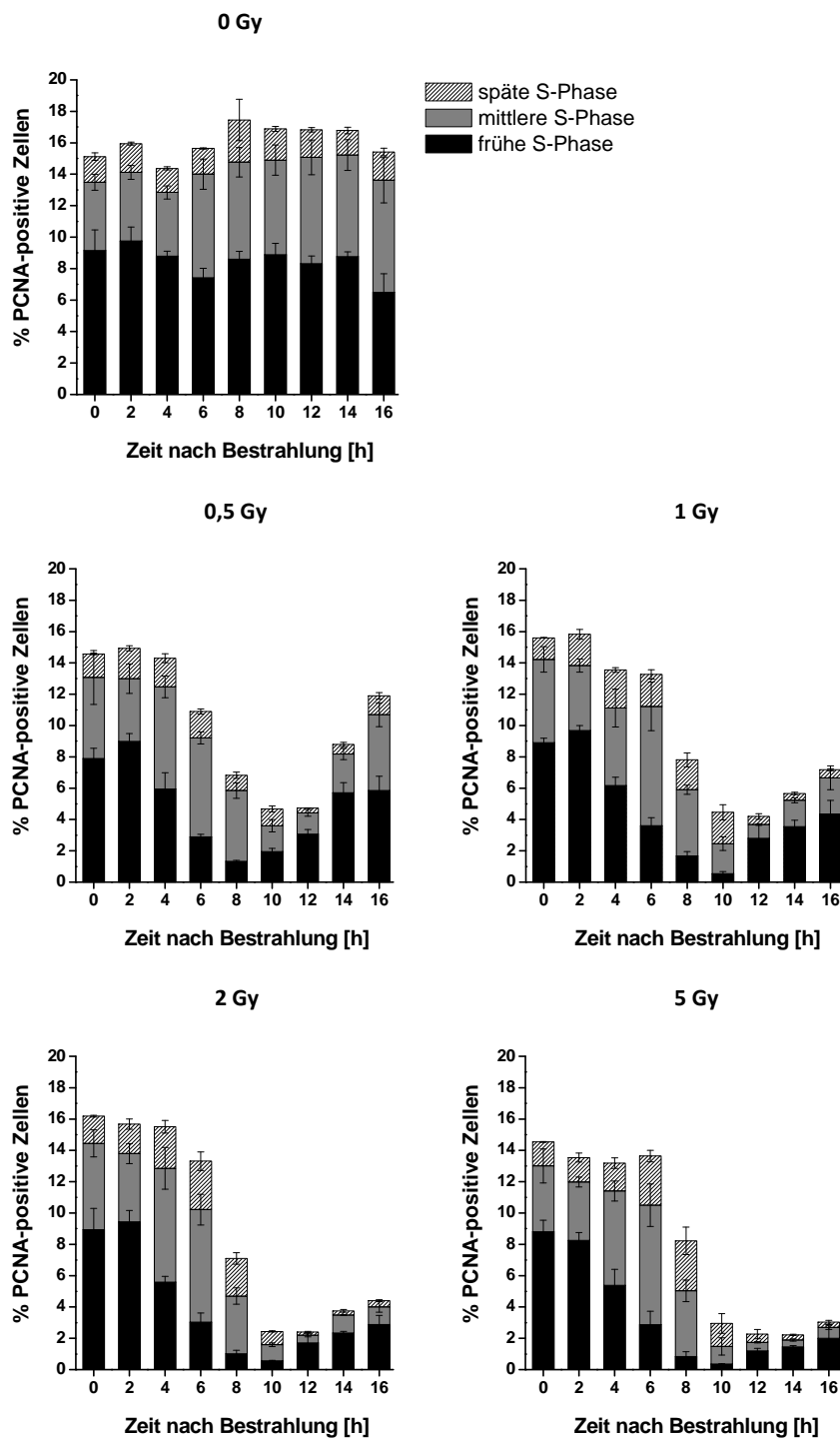


Abb. 38: Quantitative Analyse des Anteils früher, mittlerer und später S-Phase-Zellen an der gesamten Zellpopulation mittels PCNA

Exponentiell wachsende 82-6hTert-Zellen wurden mit 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy und 5 Gy bestrahlt oder unbestrahlt gelassen und anschließend Nocodazol zugegeben. Nach 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 14 h und 16 h Reparaturzeit wurden die Zellen fixiert und eine Immunfluoreszenz-Färbung gegen PCNA durchgeführt. Der Anteil der frühen, mittleren und späten S-Phase-Zellen an der gesamten Population der Zellen wurde anhand ihres spezifischen PCNA-Musters bestimmt. Die einzelnen Fraktionen wurden jeweils als prozentualer Anteil der gesamten Zellen gegen die Zeit nach Bestrahlung aufgetragen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten.

Durch die Unterteilung in frühe, mittlere und späte S-Phase-Zellen gelang es somit, die zeitliche Regulation des Einsetzens des G1/S-Checkpoints genauer zu charakterisieren. Die alleinige Betrachtung des Verhaltens der frühen S-Phase-Zellen ließ darauf schließen, dass der G1/S-Checkpoint nicht

– wie mittels Durchflusszytometrie gemessen – erst nach 6 h, sondern bereits nach ca. 4 h einsetzte. Desweiteren zeigte sich erneut, dass die Dauer der Aufrechterhaltung von der Dosis abhängig ist.

4.2.3 Messung des G1/S-Checkpoints mittels EdU/BrdU-Doppelfärbung

Mit beiden zuvor vorgestellten Methoden der Durchflusszytometrie und der Immunfluoreszenz-Mikroskopie von PCNA-gefärbten Zellen konnte das Einsetzen des G1/S-Checkpoints auf 6 h bzw. 4 h nach Bestrahlung festgelegt und ein dosisabhängiges Aufheben des G1/S-Checkpoints beobachtet werden. Allerdings besitzen beide Methoden Limitierungen in der Sensitivität. Bei der durchflusszytometrischen Analyse müssen die Zellen zunächst genügend DNA synthetisieren, bevor der Eintritt in die S-Phase messbar ist, bei der Immunfluoreszenz-Mikroskopie von PCNA-gefärbten Zellen erhält man nur einen indirekten Nachweis der Replikation von Zellen in der S-Phase.

Eine weitere Verbesserung der Messung von neu in die S-Phase eingetretenen Zellen zur Bestimmung des G1/S-Checkpoints gelingt durch den direkten Nachweis über den Einbau von BrdU in der Immunfluoreszenz-Färbung. Um ebenso wie bei der Durchflusszytometrie Zellen auszuschließen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befanden, wurde 30 min vor Bestrahlung 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) zu den Zellen gegeben. EdU ist ebenso wie BrdU ein Thymidin-Analogon und wird wie dieses statt Thymidin in die DNA eingebaut. Nach Bestrahlung wurde BrdU zugegeben und bis zum Zeitpunkt der Fixierung auf den Zellen belassen. Die Zugabe von Nocodazol sollte auch hier den Eintritt von Zellen der G2-Phase in die Mitose verhindern. Nach Fixierung und Färbung von EdU und BrdU wurden die fixierten Zellen auf den Deckgläschen mittels des Programms Metafer im Mikroskop eingescannt, die EdU-positive Fraktion der Zellen ausgeschlossen und der Anteil der BrdU-positiven, EdU-negativen Zellen ausgewertet und akkumuliert. Diese Population repräsentierte Zellen, die nach Bestrahlung in die S-Phase eingetreten waren (Abb. 39).

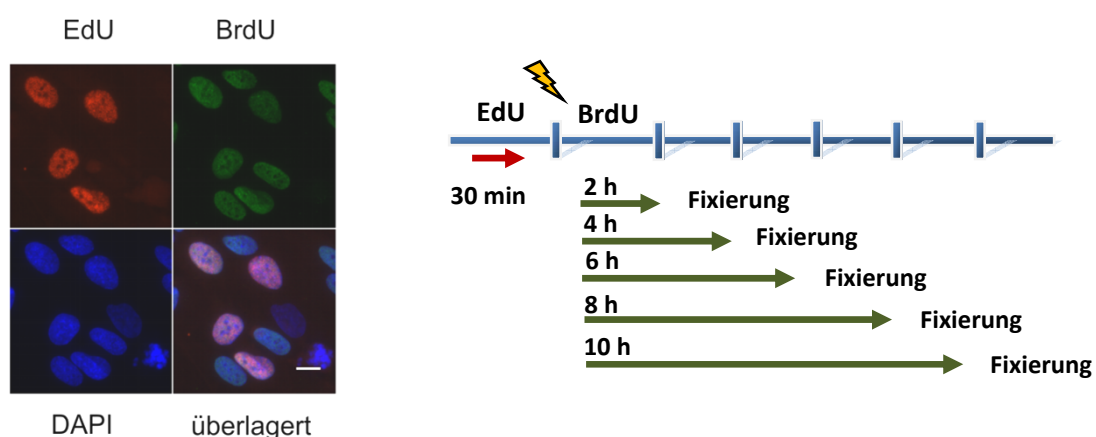


Abb. 39: EdU/BrdU-Doppelfärbung zur Messung des G1/S-Checkpoints

82-6hTert-Zellen wurden 30 min vor Bestrahlung mit EdU pulsmarkiert. Nach Bestrahlung wurde Nocodazol und BrdU zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden nach 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 10 h fixiert. Anschließend erfolgte eine Immunfluoreszenz-Färbung gegen BrdU (grün) und eine Färbung von EdU mittels Click-iT™ Kit 594 (rot). Die unspezifische Kernfärbung (blau) wurde mit DAPI durchgeführt. Schließlich wurde der Anteil EdU-negativer/BrdU-positiver Zellen an der Gesamtzahl EdU-negativer Zellen ausgewertet. Die BrdU-positive Population repräsentierte somit Zellen, welche nach Bestrahlung in die S-Phase eintraten (Maßstab = 10 µm).

Nach Bestrahlung bzw. mock-Behandlung wurde das zugegebene BrdU bis zur Ernte auf den Zellen belassen, wodurch diese BrdU während der S-Phase permanent in die DNA einbauen konnten. Der Anteil BrdU-positiver Zellen stieg kontinuierlich an, weil beständig Zellen in die S-Phase eintraten, positiv wurden und auch BrdU-positiv blieben (Abb. 40). Bestrahlte wie auch unbestrahlte Zellen stiegen in den ersten 3 h bis 4 h auf 10 % bis 15 % an, bestrahlte Zellen zeigten eine leichte Verzögerung mit zunehmender Dosis. Danach blieben die Werte der bestrahlten Proben relativ konstant, was auf das Einsetzen des G1/S-Checkpoints hindeutete.

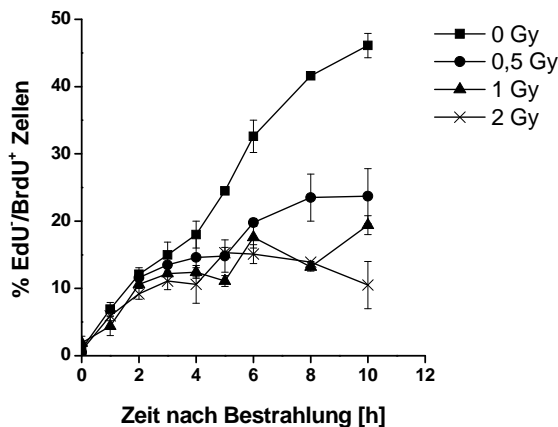


Abb. 40: G1/S-Checkpoint Messung mittels EdU/BrdU-Doppelmarkierung

Exponentiell wachsende 82-6hTert-Zellen wurden mit 0,5 Gy, 1 Gy und 2 Gy bzw. 0,2 Gy, 0,5 Gy und 1 Gy bestrahlt, eine unbestrahlte Kontrolle wurde mitgeführt. Anschließend wurde Nocodazol zu den Zellen gegeben. Aufgetragen wurde der Anteil BrdU-positiver Zellen an EdU-negativen Zellen zu den Fixierungszeitpunkten 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h und 10 h. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler aus 3 bis 4 unabhängigen Experimenten an.

Die Ergebnisse der EdU/BrdU-Doppelfärbung zeigten ebenfalls, dass der G1/S-Checkpoint langsam einsetzte. Bei 82-6hTert-Zellen war ein Einsetzen bereits nach 3 h bis 4 h erkennbar. Die Auswertung über Immunfluoreszenz ist somit sensitiver als die Messung über Durchflusszytometrie, da schon wenige Minuten BrdU-Einbau in die DNA genügen, um eine Zelle als BrdU-positiv zu bewerten. Das Einsetzen des G1/S-Checkpoints ist hierdurch früher zu ermitteln.

Mit den bisher dargestellten Methoden konnte gezeigt werden, dass der G1/S-Checkpoint langsam einsetzt und erst 4 h bis 6 h nach Bestrahlung vollständig aktiviert ist. Durch Erhöhung der Strahledosis konnte eine Verlangsamung des S-Phase-Eintritts erreicht werden, jedoch kein vollständiges Einsetzen zu frühen Zeiten. Die Länge der Aufrechterhaltung des Checkpoints war abhängig von der Höhe der Bestrahlung, wobei eine höhere Bestrahlung zu einem längeren Arrest führte und die Dauer des Arrests abhängig vom Schadenslevel zu sein schien.

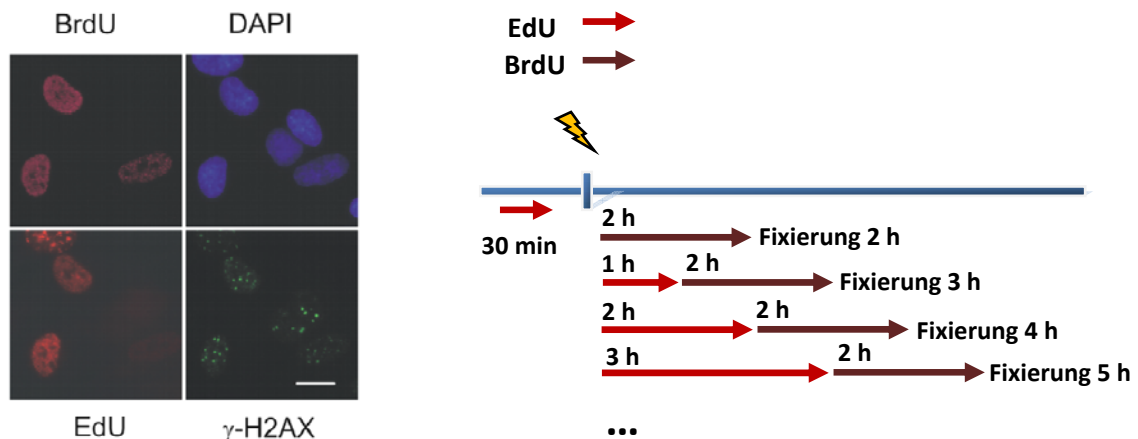
4.3 Beurteilung des Schadenslevels in der frühen S-Phase

Der G1/S-Checkpoint setzt nur langsam ein und selbst nach Bestrahlung mit höheren Dosen ist lediglich eine Verlangsamung des S-Phase-Eintritts zu beobachten. Dies legt die Vermutung nahe, dass Zellen mit vielen DSBs in die S-Phase eintreten, da kaum Zeit für die Reparatur zur Verfügung gestellt wird. Um die Anzahl von DSBs in Zellen untersuchen zu können, die nach unterschiedlich langen Reparaturzeiten nach Bestrahlung erst kurz zuvor in die S-Phase progressiert waren, wurde der Doppelmarkierungsansatz mit EdU/BrdU erweitert. Dabei wurden die Zellen zusätzlich gegen γ -H2AX gefärbt, um das Schadenslevel bestimmen zu können. Zu exponentiell wachsenden WT-Zellen

wurde 30 min vor Bestrahlung EdU gegeben. Das EdU verblieb in diesem Experiment über die Bestrahlung hinweg im Medium und wurde erst 2 h vor Fixierung durch BrdU ersetzt. Die EdU-negative/BrdU-positive Population entsprach den Zellen, die in den letzten 2 h vor Fixierung in die S-Phase eingetreten waren.

Die γ -H2AX-Foci wurden in BrdU-positiven Zellen der frühen S-Phase ausgewertet. Zusätzlich erfolgte die Quantifizierung von γ -H2AX in G1-Phase-Zellen. Die G1-Population entsprach EdU-negativen Zellen mit einfachem DNA-Gehalt.

A



B

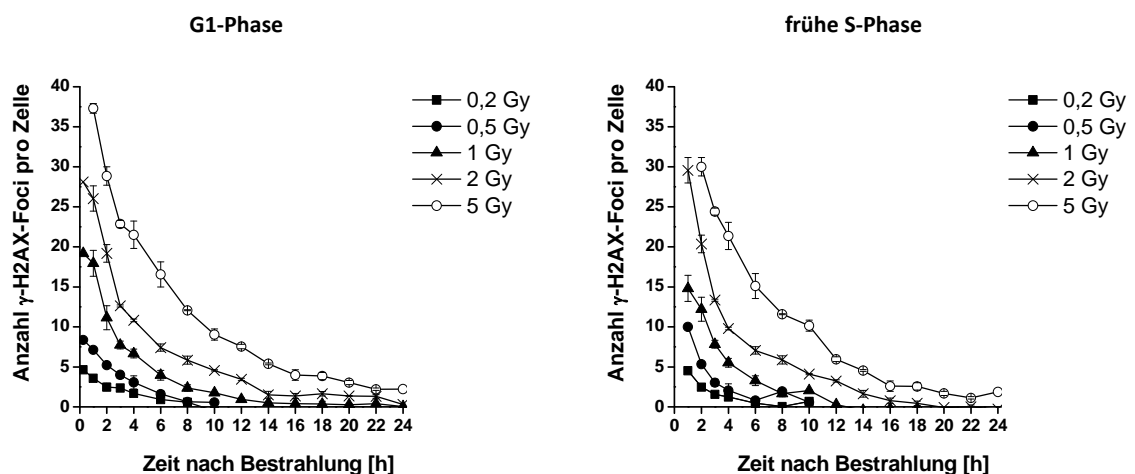


Abb. 41: Färbung mit EdU/BrdU zur Markierung der S-Phase und γ -H2AX zur Identifizierung von DSBs

(A) Exponentielle, auf Deckgläschen wachsende 82-6hTert-Zellen wurden 30 min vor Bestrahlung mit 0,2 Gy, 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy oder 5 Gy mit EdU markiert. 2 h vor Fixierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und EdU durch BrdU ersetzt. Die Zeitpunkte der Fixierung nach Bestrahlung lagen zwischen 15 min und 24 h. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen γ -H2AX (grün) zur Quantifizierung der DNA-Doppelstrangbrüche und gegen BrdU (Cy5) sowie EdU (rot) zur Abgrenzung der frühen S-Phase durchgeführt (Maßstab = 10 μ m).

(B) Nach Einscannen der Zellen im Mikroskop über die Software Metafer wurden γ -H2AX-Foci in EdU-negativen Zellen der G1-Phase und in EdU-negativen und BrdU-positiven Zellen der frühen S-Phase ausgezählt. Dies entsprach der Population an Zellen, die innerhalb der letzten 2 h vor Fixierung in die S-Phase getreten waren. Der gezeigte Standardfehler setzt sich aus den Werten von 3 bis 4 unabhängigen Experimenten zusammen.

Bestrahlte Zellen besaßen in der frühen S-Phase ein ähnliches Foci-Level wie G1-Phase-Zellen. Dies zeigt, dass Zellen der G1-Phase während der ersten Stunden nach Bestrahlung mit einem hohen

Schadenslevel in die S-Phase gelangten. 6 h nach Bestrahlung nahm die Anzahl BrdU-positiver Zellen ab, wodurch ebenfalls das Einsetzen des G1/S-Checkpoints angenommen werden kann. Dieses Ergebnis ist konsistent zu den Beobachtungen, die mittels LCI gemacht wurden.

4.4 Mechanistische Studien: Anteile von ATR und ATM bei der Checkpoint-Induktion

Die überraschenden Ergebnisse über das langsame Einsetzen des G1/S-Checkpoints nach IR ließen darauf schließen, dass das über die Kinase ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) ablaufende *Signaling* nach DSB-Induktion nicht sehr schnell zu sein scheint. In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass diese langsame Antwort des G1/S-Checkpoints ATM-abhängig ist (Deckbar *et al.*, 2010). Nach Bestrahlung setzt direkt ein *Signaling* ein, das aber erst nach mehreren Stunden zu einem vollständigen Arrest führt. Es stellte sich nun die Frage, ob der G1/S-Checkpoint über andere Signaltransduktionskaskaden aktiviert werden kann, die eine andere zeitliche Regulation nach sich ziehen, oder ob das langsame Einsetzen des Checkpoints ein generelles Phänomen darstellt. Für eine Modifizierung des Signals wurde die Bestrahlung mit ultravioletem (UV) Licht bei 254 nm (UVC) gewählt. Die direkten Schäden an der DNA bei dieser Art der Bestrahlung sind vor allem Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs) und 6-4-Photoprodukte (6-4PPs). Die Folge dieser Schäden ist das Erliegen von Transkription und Replikation der DNA durch Verzerrung der DNA-Struktur. Die Polymerasen werden an diesen Stellen arretiert, was zur Entstehung von Einzelstrangbrüchen führt. Die Schäden werden von der Zelle durch die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) behoben. Es gibt Hinweise über eine UV-abhängige Aktivierung von ATR (*ATM and Rad3 related*) (Stiff *et al.*, 2008). So wurde beschrieben, dass es während der Reparatur über NER zu einzelsträngigen Bereichen im entsprechenden DNA-Abschnitt kommt, diese Bereiche werden von RPA (*Replication Protein A*) bedeckt. Dies ist das initiale Signal für die Aktivierung von ATR, das im Komplex mit dem *ATR Interacting Protein* (ATRIP) vorliegt. Die Aktivierung von ATR führt zu einem vorübergehenden Zellzyklus-Arrest über die Phosphorylierung von Chk1. Über die Fähigkeit von UVC-Bestrahlung, ATR in Phasen außerhalb der S-Phase zu aktivieren, gibt es widersprüchliche Aussagen (Ward *et al.*, 2004, Marini *et al.*, 2006).

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte untersucht werden, ob sich Unterschiede in der zeitlichen Regulation des G1/S-Checkpoints beim Vergleich von UVC-Bestrahlung zu IR ergeben und inwiefern sich das *Signaling* über ATM bzw. ATR unterscheidet. Weiterhin sollte die Regulation des G1/S-Checkpoints mit der des G2/M-Checkpoints nach IR und UVC-Bestrahlung verglichen werden.

4.4.1 Überprüfung des Protein-Status von ATM und ATR mittels Western Blot

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden die hTert-transfizierten Zelllinien 82-6hTert und F02-98hTert sowie die primäre humane, ATM-defiziente Zelllinie AT7Bi gewählt.

Die Zelllinie F02-98hTert, auch bekannt als Seckel-Zellen, ist wie 82-6hTert eine immortalisierte Fibroblasten-Zelllinie. Die primären Zellen wurden ursprünglich einem Patienten mit Seckel-

Syndrom entnommen, welches auf eine Defizienz in ATR zurückzuführen ist (Goodship *et al.*, 2000), was sich auf zellulärer Ebene in einer Beeinträchtigung der DNA-Schadensantwort auswirkt (O'Driscoll *et al.*, 2003). AT7Bi sind primäre humane Hautfibroblasten mit einem Defekt im ATM-Gen, die von einem AT-Patienten stammen. Auf zellulärer Ebene zeigt sich ein Fehlen von ATM in einer verstärkten chromosomalen Instabilität und hoher Empfindlichkeit gegenüber IR. Die Zellen zeichnen sich durch Defekte am G1/S-Checkpoint, Intra-S-Checkpoint und G2/M-Checkpoint aus (Lavin und Shiloh, 1997).

Zunächst sollte der Status der drei in den folgenden Versuchen verwendeten Zelllinien 82-6hTert, F02-98hTert und AT7Bi in Bezug auf Vorhandensein und Fehlen von ATR und ATM überprüft werden.

Zur Überprüfung der Proteine wurde ein Western Blot durchgeführt, indem zunächst Lysate exponentiell wachsender Zellen aller drei Zelllinien hergestellt wurden. Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte über Gel-Elektrophorese mittels eines 7 % Polyacrylamid-Gels. Im Anschluss wurden die Proteine des Gels auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und durch spezifische Antikörper gegen ATR und ATM über Chemilumineszenz nachgewiesen.

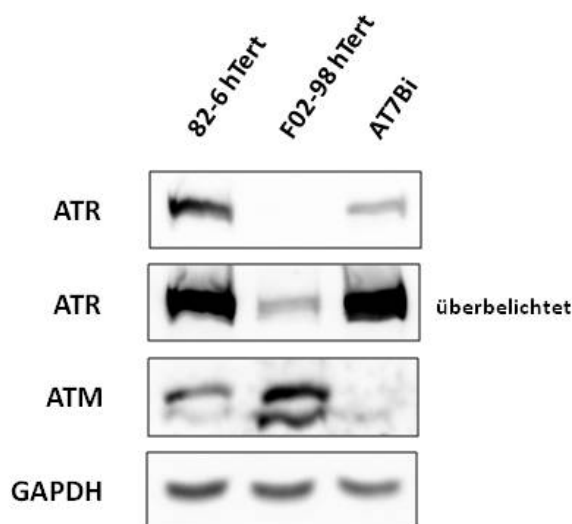


Abb. 42: Western Blot zum Nachweis der Proteine ATM und ATR

Für die Gewinnung der Proteine aus 82-6hTert-, F02-98hTert- und AT7Bi-Zellen wurden die entsprechenden Zelllinien in Zellkulturschalen ausgesät und 48 h inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Abschaben vom Boden der Zellkulturschalen. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in Lysepuffer aufgenommen und die Zellen mittels Ultraschall aufgebrochen. Von jeder Zelllinie wurde nach Konzentrationsbestimmung (Bradford-Test) die gleiche Menge Protein auf ein Polyacrylamid-Gel (7 %) aufgetragen. Nach Auftrennung im Gel wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mittels spezifischer Antikörper gegen ATR und ATM nachgewiesen. GAPDH diente als interne Kontrolle.

Bei der WT-Zelllinie 82-6hTert konnte sowohl das Protein ATR als auch ATM nachgewiesen werden (Abb. 42). F02-98hTert-Zellen hingegen zeigten nur ein Signal bei ATM, das Protein ATR war lediglich bei starker Überbelichtung des Blots schwach zu erkennen. Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass F02-98hTert eine verminderte Expression des ATR-Proteins zeigten (O'Driscoll *et al.*, 2003). Entgegengesetzt zeigte sich das Vorhandensein der Proteine bei AT7Bi. ATR war, etwas schwächer als bei 82-6hTert, vorhanden, ATM hingegen konnte nicht detektiert werden. Die untere der beiden Banden, welche bei ATM auf dem Western Blot erkennbar war, ist auf eine unspezifische Bindung des Antikörpers zurückzuführen.

Bei den verwendeten Zellen konnte somit der erwartete Protein-Status der Proteine ATM und ATR in den für die folgenden Versuche verwendeten Zelllinien nachgewiesen werden.

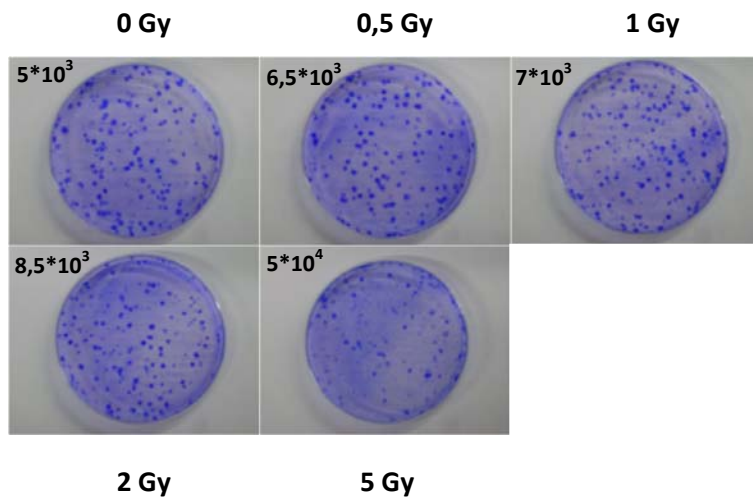
4.4.2 Überlebensexperimente mit 82-6hTert und F02-98hTert-Zellen nach IR und UVC

Im weiteren Verlauf sollte der G1/S-Checkpoint nach Bestrahlung mit UVC untersucht und nach Bestrahlung mit IR verglichen werden. Bei IR wurden Dosen von 0,5 Gy bis 5 Gy gewählt. Die Fluenzen für die UVC-Bestrahlung sollten ähnlich starke Effekte im Hinblick auf das Zellüberleben wie die ionisierende Strahlung hervorrufen. Daher wurden die Effekte von IR und UVC-Bestrahlung auf die Zellen in Überlebensexperimenten miteinander verglichen.

Überlebensexperimente wurden ursprünglich entwickelt, um die Auswirkungen von Strahlung auf Zellen zu untersuchen und spielen eine wesentliche Rolle in der Strahlenbiologie. Überlebensexperimente oder *Cell Survival Assays* ermitteln die Proliferationsfähigkeit einer Zelle und die Erhaltung ihrer reproduktiven Fähigkeiten zur Bildung von Kolonien oder Klonen. Als klonogen bezeichnet man Zellen, welche auch nach Bestrahlung über reproduktive Integrität und Proliferationsfähigkeit zur Bildung von Klonen oder Kolonien verfügen (Hall, 2006). Eine Überlebenskurve wird demnach definiert als Beziehung zwischen Dosis des Agens (hier UVC-Strahlung oder IR), um einen Effekt auszulösen, und dem Anteil von Zellen, welche ihre Fähigkeit zur Reproduktion behalten. Die hier eingesetzten Fluenzen zwischen 3 J/m^2 und 30 J/m^2 wurden in Arbeiten über die Auswirkungen von UVC-Bestrahlung auf humane Zellen verwendet (Attardi *et al.*, 2004, Marini *et al.*, 2006, Callegari und Kelly, 2007).

Vorab wurde in einem Experiment die *Plating Efficiency* (PE) der jeweiligen Zelllinie, d.h. der Prozentsatz von unbehandelten Zellen, die sich nach der Aussaat im neuen Kulturgefäß absetzen, sich teilen und Kolonien bilden, ermittelt. Hierzu wurde eine festgelegte Anzahl von Zellen in einer Zellkulturschale ausgesät und als Kolonie eine Ansammlung von Zellen bewertet, welche aus mindestens 50 Einzelzellen bestand. Die PE errechnet sich aus dem Verhältnis der gezählten Kolonien zur Anzahl der ausgesäten Zellen. Die PE für 82-6hTert-Zellen lag bei durchschnittlich 4,4 %, für F02-98hTert bei 5,8 %. Anhand der PE wird anschließend berechnet, wie viele Zellen für den eigentlichen Versuch ausgesät werden müssen, um eine bestimmte Anzahl gut auszählbarer Kolonien zu erhalten. Nach Bestrahlung der Zellen errechnete sich der Anteil der überlebenden Zellen (*Surviving Fraction*, SF) über die PE der Kontrollen. Die SF wurde innerhalb des Bereichs von 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy und 5 Gy und 3 J/m^2 , 6 J/m^2 , 9 J/m^2 , 12 J/m^2 , 15 J/m^2 und 30 J/m^2 bestimmt und anhand einer *Survival Curve* dargestellt. Exponentiell wachsende 82-6hTert- und F02-98hTert-Zellen wurden mit Dosen von 0,5 Gy bis 5 Gy und Fluenzen zwischen 3 J/m^2 und 30 J/m^2 bestrahlt und anschließend in Zellkulturschalen ausgesät. Dabei wurde die Anzahl der auszusäenden Zellen für jede Dosis oder Fluenz so gewählt, dass etwa 100 bis 300 Kolonien anwuchsen. Die Zellzahlen wurden in Vorversuchen ermittelt. Sowohl für 82-6hTert als auch für F02-98hTert betrug die Wachstumszeit bis zur Ausbildung zählbarer Kolonien 11 Tage. Nach dieser Zeit erfolgte die Fixierung und Färbung der Zellen in einem Schritt mit einer Lösung aus 0,1% Kristallviolett in 25% Ethanol.

A



B

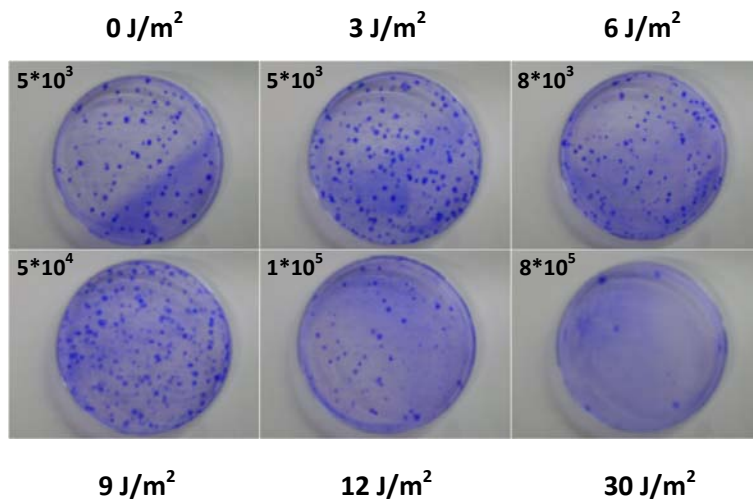


Abb. 43: Exemplarische Darstellung der Kolonien der Überlebensexperimente mit 82-6hTert-Zellen nach IR und UVC-Bestrahlung

Die Aufnahmen zeigen exemplarisch eine Kristallviolett-Färbung von 82-6hTert-Kolonien nach steigenden Dosen IR (A) und steigenden Fluenzen UVC (B) nach 11 Tagen Inkubation. Die Anzahl der ausgesäten Zellen nach Bestrahlung mit IR und UVC sind im jeweiligen Bild angegeben. In jeder Zellkulturschale sollten sich 100 bis 300 Kolonien bilden.

Die Aufnahmen in Abb. 43 zeigen mit Kristallviolett gefärbte Kolonien nach Bestrahlung mit 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy und 5 Gy (A) und 3 J/m², 6 J/m², 9 J/m², 12 J/m² und 30 J/m² (B) oder unbestrahlt.

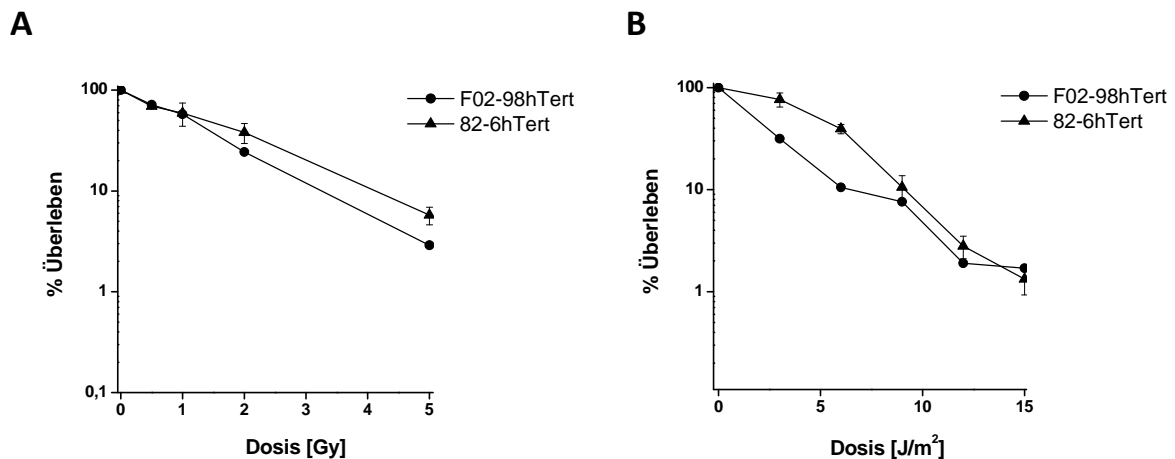


Abb. 44: Überlebensexperimente mit 82-6hTert- und F02-98hTert-Zellen nach IR und UVC-Bestrahlung

Die exponentiell wachsenden 82-6hTert-Zellen oder F02-98hTert-Zellen wurden mit 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy und 5 Gy (A) bzw. 3 J/m^2 , 6 J/m^2 , 9 J/m^2 , 12 J/m^2 , 15 J/m^2 und 30 J/m^2 (B) bestrahlt oder unbestrahlt belassen. Nach Bestrahlung wurden die Zellen abtrypsinisiert und in Vorexperimenten bestimmte, definierte Zellzahlen ausgesät, um nach Ende der Inkubationszeit zwischen 100-300 Kolonien zu erhalten. 11 Tage nach Aussaat wurden die gewachsenen Kolonien fixiert, mit Kristallviolett gefärbt und ausgezählt. Der Wert bei 30 J/m^2 wurde zur besseren Vergleichbarkeit beider Zelllinien nicht im Graphen (B) dargestellt. Die Fehlerbalken der mit 82-6hTert durchgeführten Experimente geben die Standardfehler von 5 unabhängigen Versuchen an. Die Experimente mit F02-98hTert wurden nur ein Mal jeweils für IR und UVC-Bestrahlung durchgeführt.

Nach Auswertung der Kolonien zeigte der Verlauf der Kurve von 82-6hTert-Zellen mit IR einen Rückgang des Anteils der überlebenden Zellen auf 70 % bei 0,5 Gy und auf 60 % bei 1 Gy (Abb. 44 A). Bei weiterer Verdopplung der Dosis auf 2 Gy wurde ein Anteil von 38 % überlebender Zellen, bei Bestrahlung mit 5 Gy wurden noch etwa 6 % überlebende Zellen gemessen. Ein ähnliches Bild wie bei IR von 82-6hTert-Zellen ergab sich bei IR von F02-98hTert-Zellen nach 0,5 Gy und 1 Gy. Nach Bestrahlung mit 2 Gy überlebten nur noch 24 % der ursprünglich ausgesäten Zellen. 3 % überlebende Zellen wurden bei Bestrahlung mit 5 Gy gezählt. Bei höheren Dosen zeigten sich diese Zellen etwas strahlenempfindlicher.

Nach UVC-Bestrahlung der 82-6hTert-Zellen mit 3 J/m^2 war der Anteil der überlebenden Zellen im Vergleich zu unbestrahlten Zellen auf 76 % abgesunken (Abb. 44 B). Ein deutlicherer Abfall der überlebenden Fraktion auf 40 % wurde bei Verdopplung der Fluenz auf 6 J/m^2 festgestellt. Kaum noch überlebende Zellen konnten nach Bestrahlung mit 30 J/m^2 gezählt werden. Bei Bestrahlung der ATR-defizienten Zelllinie F02-98hTert mit 3 J/m^2 ergab sich eine deutlichere Abnahme der überlebenden Zellen auf 31 %. Sie reagierten bei niedrigen Fluenzen wesentlich empfindlicher als der WT. Nach 6 J/m^2 konnten nur noch 10 % überlebende Zellen gemessen werden. Bei weiterer Erhöhung der Fluenz zeigte sich zwar ein weiterer Rückgang der überlebenden Fraktion, die sich aber dem WT angleich. Allerdings befand man sich bei Dosis und Fluenz in einem Bereich, in dem kaum noch Zellen überlebten und die Messung dadurch unzuverlässiger wurde. F02-98hTert-Zellen zeigten im Vergleich zur Wildtyp-Zelllinie 82-6hTert normale zelluläre Sensitivität gegenüber Bestrahlung mit IR. Dieses Ergebnis zeigt, dass ATR nicht zur Strahlenresistenz nach IR beiträgt. Eine verstärkte Sensitivität von F02-98hTert-Zellen im Vergleich zu 82-6hTert-Zellen war bei Bestrahlung mit UVC erkennbar. Dies lässt auf eine beeinträchtigte DNA-Schadensantwort im Zuge der verminderten ATR-

Funktion dieser Zellen schließen. Weiterhin sind diese Ergebnisse konsistent mit den Daten der Erstbeschreibung der primären F02-98-Zellen (O'Driscoll *et al.*, 2003).

In Experimenten mit IR wurden Dosen von 0,5 Gy bis 5 Gy verwendet, was einem Überleben von 10 % bei 5 Gy entspricht. Für UVC-Bestrahlung sollte ein Fluenzbereich gewählt werden, der ähnliche Effekte auf das Überleben der Zellen wie IR hervorruft. In zukünftigen Experimenten wurden daher Fluenzen bis 12 J/m² gewählt, höhere Fluenzen zeigten sich lethal für die Zellen. Der lethale Dosisbereich bei der Bestrahlung mit IR wurde bis zu einer Dosis von 5 Gy nicht erreicht, abgeschätzt liegt er bei 8-10 Gy (Rothkamm *et al.*, 2001, O'Driscoll *et al.*, 2003).

4.4.3 Messung des G1/S-Checkpoints nach IR und UVC-Bestrahlung über EdU/BrdU-Markierung

Die bisher erhaltenen Ergebnisse zum G1/S-Checkpoint nach ionisierender Bestrahlung zeigen einen Checkpoint, der zwischen 4 h und 6 h nach Bestrahlung einsetzt. Eine Erhöhung der Strahlendosis verlangsamte zwar den Eintritt in die S-Phase, ein vollständiges Einsetzen zu frühen Zeiten wurde jedoch nicht erreicht.

Zum Vergleich des Verhaltens IR und UVC-bestrahlter Zellen am G1/S-Checkpoint wurde zunächst die Methode der EdU-/BrdU-Doppelmarkierung verwendet (siehe Kapitel 4.2.3). Die Zelllinien 82-6hTert, F02-98hTert und die ATM-defiziente primäre Zelllinie AT1BR wurden 30 min nach EdU-Behandlung mit 0,2 Gy, 0,5 Gy und 1 Gy bestrahlt. Nach Bestrahlung wurde BrdU und Nocodazol zugegeben. Ausgewertet wurde der Anteil EdU-negativer und BrdU-positiver Zellen, da diese Zellen die Population darstellten, die nach Bestrahlung in die S-Phase eingetreten war (Abb. 45 A).

Der Anteil EdU-negativer und BrdU-positiver Zellen der unbestrahlten Proben von 82-6hTert, F02-98hTert und AT7Bi stieg bei allen Zelllinien an. Sie traten über einen Zeitraum von 10 h gleichmäßig in die S-Phase ein. F02-98hTert-Zellen stiegen in den ersten Stunden nach Bestrahlung relativ langsam im Vergleich zu 82-6hTert-Zellen an. In beiden Zelllinien konnte eine dosisabhängige Verlangsamung des S-Phase-Eintritts beobachtet werden. Ab 3 h bei 82-6hTert-Zellen bzw. 4 h bei F02-98hTert-Zellen gingen die Werte der bestrahlten Proben in ein Plateau über. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Checkpoint aktiviert wurde und keine Zellen mehr in die S-Phase gelangten. Die Verlangsamung des S-Phase-Eintritts zu frühen Zeiten, gefolgt von einem vollständigen Einsetzen des Checkpoints, wie es bei 82-6hTert und F02-98hTert beobachtet wurde, ist abhängig von ATM. Dagegen zeigten bestrahlte AT1BR-Zellen weder die Verzögerung zu frühen Zeiten, noch ein Plateau zu späten Zeiten nach IR. Beide Prozesse sind somit abhängig von ATM und konnten durch Experimente des Partner-Labors von P. A. Jeggo mit synchronisierten Zellen bestätigt werden (Deckbar *et al.*, 2010).

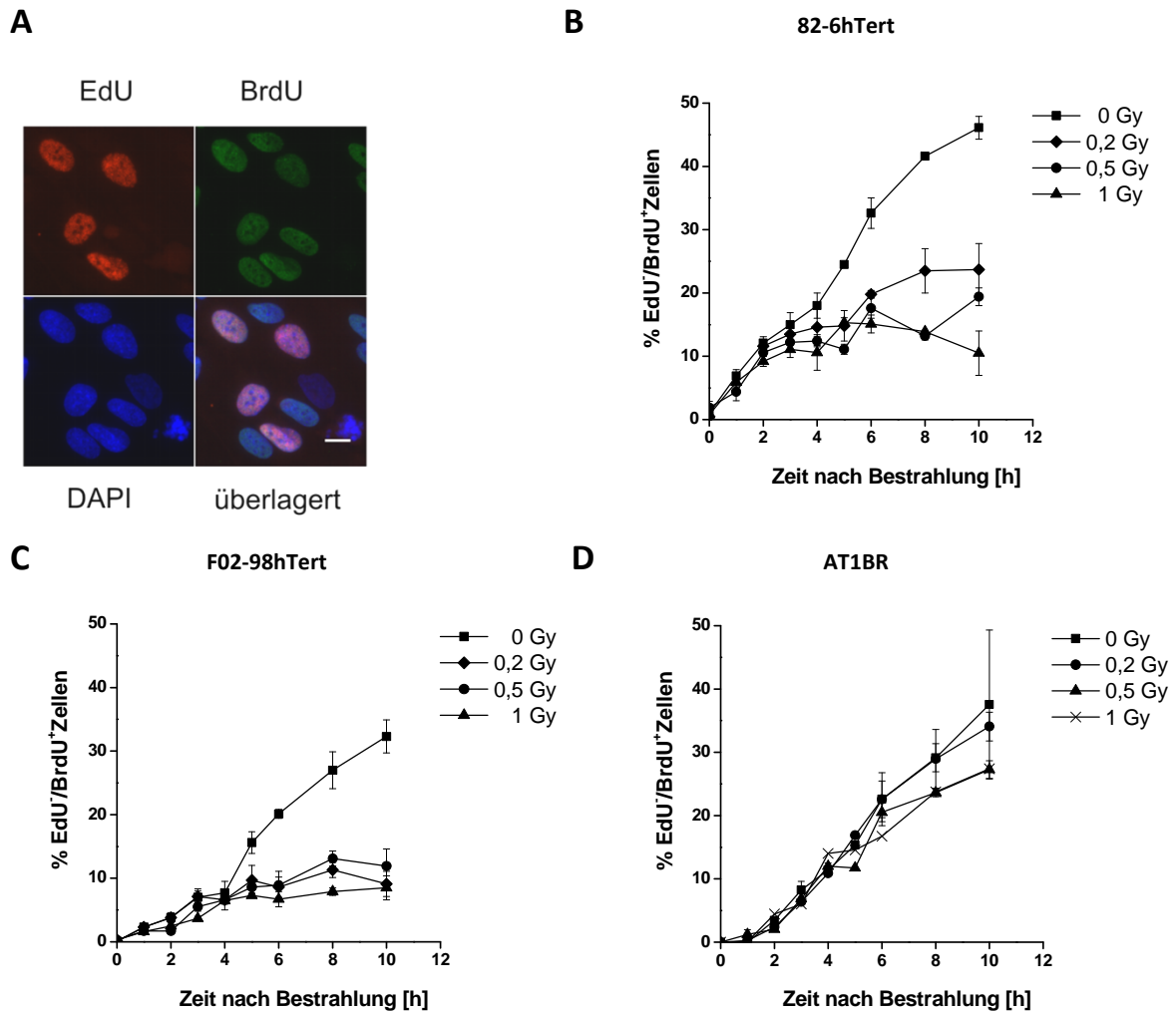


Abb. 45: Messung des G1/S-Checkpoints über EdU/BrdU-Markierung nach IR

Exponentiell wachsende 82-6hTert- (B), F02-98hTert- (C) und AT1BR- (D) Zellen wurden 30 min vor Bestrahlung mit 0,2 Gy, 0,5 Gy und 1 Gy mit EdU pulsmarkiert, um so die vor der Bestrahlung vorhandenen S-Phase-Zellen zu identifizieren. Eine Probe jeder Zelllinie und jedes Zeitpunkts diente als Kontrolle und wurde nicht bestrahlt. BrdU und Nocodazol wurden nach Bestrahlung zugegeben. Ausgewertet wurden EdU-negative, BrdU-positive Zellen (A). Diese Gruppe repräsentiert den Anteil der Zellen, die nach Bestrahlung in die S-Phase eintraten. Die Daten der 82-6hTert-Zellen wurden in Kapitel 4.2.3 bereits dargelegt und an dieser Stelle zum besseren Vergleich nochmals gezeigt. Die Daten des Graphen AT1BR (D) wurden freundlicherweise von Dr. D. Deckbar zur Verfügung gestellt. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten.

Um die zeitliche Regulation des G1/S-Checkpoints nach UVC-Bestrahlung sowie dessen Abhängigkeit von ATM und ATR zu untersuchen, wurde die Methode der EdU/BrdU-Markierung der Zellen auch bei Bestrahlung mit UVC verwendet. Das EdU-haltige Medium wurde vor Bestrahlung entfernt, um zu verhindern, dass der Farbstoff des Zellkultur-Mediums UVC-Licht absorbiert. Sofort nach der Bestrahlung erfolgte die Zugabe von frischem, BrdU- und Nocodazol-haltigem Medium.

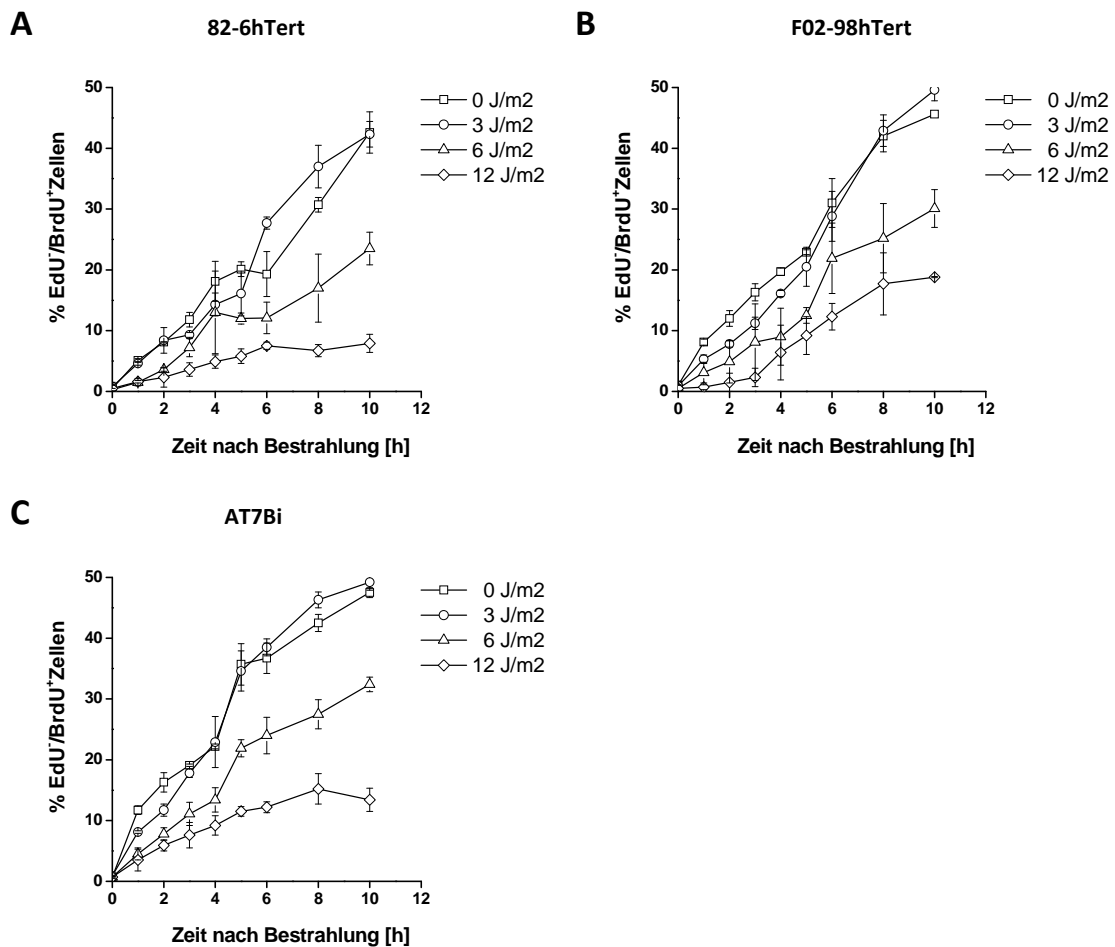


Abb. 46: Messung des G1/S-Checkpoints über EdU/BrdU-Markierung nach UVC-Bestrahlung

Exponentiell wachsende 82-6hTert- (A), F02-98hTert- (B) und AT7Bi- (C) Zellen wurden mit EdU 30 min vor Bestrahlung mit 3 J/m², 6 J/m² und 12 J/m² pulsmarkiert, um so die vor der Bestrahlung vorhandenen S-Phase-Zellen zu identifizieren. Eine Probe jeder Zelllinie diente als Kontrolle und wurde nicht bestrahlt. Die für die Bestrahlung verwendeten Fluenzen lagen zwischen 3 J/m² und 12 J/m². BrdU und Nocodazol wurden nach Bestrahlung zugegeben. Ausgewertet wurden die EdU-negativen, BrdU-positiven Zellen. Diese Gruppe repräsentiert den Anteil der Zellen, die nach Bestrahlung in die S-Phase eintraten. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung zwischen 3 Experimenten bei 82-6hTert-Zellen und jeweils 2 Experimenten bei F02-98hTert- und AT7Bi-Zellen.

82-6hTert-Zellen zeigten bei Bestrahlung mit 3 J/m² einen ähnlich starken Anstieg der EdU-negativen und BrdU-positiven Zellen wie die unbestrahlte Kontrolle (Abb. 46 A). Der Anstieg erfolgte kontinuierlich auf mehr als 40 % BrdU-positiver Zellen bis 10 h nach Bestrahlung. Wurden die Zellen mit 6 J/m² bestrahlt, verringerte sich schon ab der ersten Stunde nach Bestrahlung der Anteil der Zellen, die im Vergleich zu unbestrahlten Zellen in die S-Phase eintraten. Die Werte der mit 6 J/m² bestrahlten Zellen zeigten eine 2- bis 3-stündige Verzögerung, die Werte lagen kontinuierlich unter denen der unbestrahlten Zellen. Die bestrahlten Zellen traten in 2 Wellen in die S-Phase ein. Die erste Welle zeigte sich nach einer Verzögerung von 1 h bis 2 h gegenüber unbestrahlten Zellen, gefolgt von einem kurzen Plateau. Die zweite Welle wurde zwischen 6 h und 8 h nach Bestrahlung deutlich. Mit 3 J/m² bestrahlte F02-98hTert-Zellen (Abb. 46 B) zeigten ebenfalls nur geringe Unterschiede beim Eintritt in die S-Phase zu unbestrahlten Zellen, welche beide auf einen Wert von über 40 % BrdU-positiven S-Phase-Zellen anstiegen. Bei den mit 6 J/m² und 12 J/m² bestrahlten Zellen

konnte ein langsamerer Anstieg von EdU-negativen, BrdU-positiven Zellen festgestellt werden. Die Werte BrdU-positiver S-Phase-Zellen nach 10 h Reparaturzeit lagen bei allen Fluenzen höher als bei 82-6hTert. Kurz nach Bestrahlung zeigten F02-98hTert-Zellen ein ähnliches Verhalten wie WT-Zellen, nach längeren Zeiten war allerdings ein massiverer Eintritt der Zellen in die S-Phase zu beobachten. AT7Bi-Zellen (Abb. 46 C) zeigten einen ähnlichen Verlauf des Anstiegs BrdU-positiver Zellen in die S-Phase wie auch 82-6hTert-Zellen, die Werte nach einer Reparaturzeit von 10 h nach Bestrahlung mit 3 J/m^2 lagen bei fast 50 %, die der unbestrahlte Kontrolle bei 47 %. Nach Bestrahlung mit 6 J/m^2 und 12 J/m^2 lagen die Werte bei 32 % und 13 % BrdU-positive Zellen.

Diese Experimente zeigten, dass die Bestrahlung mit UVC die Rate an Zellen, die in die S-Phase eintreten, verringert. Diese Beobachtung wurde bei allen Zelllinien, unabhängig von ATM- oder ATR-Status gemacht. Interessanterweise erkannte man im Gegensatz zur Bestrahlung mit IR einen massiven Effekt direkt nach Bestrahlung, ebenfalls war kein vollständiger Arrest zu späteren Zeiten wie nach Bestrahlung mit IR erkennbar.

4.4.4 Messung des G1/S-Checkpoints nach IR mittels Durchflusszytometrie

Die bisherigen Ergebnisse legten nahe, dass sich der G1/S-Übergang nach UVC-Bestrahlung von der Bestrahlung mit IR unterscheidet. Diese Ergebnisse sollten mit weiteren Methoden, hier der Durchflusszytometrie (siehe Kapitel 4.2.1), validiert werden.

F02-98hTert-Zellen wurden in diesem Ansatz nicht verwendet, da alle bisherigen Ergebnisse zeigten, dass sie sich nach IR den G1/S-Checkpoint betreffend nicht anders als WT-Zellen verhielten. Zunächst wurden 82-6hTert- und AT7Bi-Zellen 1 h mit BrdU markiert und mit 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy und 5 Gy bestrahlt oder unbestrahlt belassen. Danach erfolgte die Zugabe von Nocodazol. Die Zellen wurden nach Reparaturzeiten von 2 h bis 16 h bzw. bis 24 h fixiert, gefärbt und im Durchflusszytometer vermessen.

Bei unbestrahlten WT-Zellen stieg der Anteil BrdU-negativer S-Phase-Zellen über einen Zeitraum von 6 h an (Abb. 47 A). Dieser Wert blieb über einen Zeitraum von 8 h relativ konstant und nahm 14 h nach Beginn der Messungen wieder ab.

Bei Bestrahlung der 82-6hTert-Zellen mit 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy und 5 Gy konnte in den ersten 6 h nach Bestrahlung nur eine leichte Verlangsamung des Eintritts BrdU-negativer Zellen in die S-Phase im Vergleich zur unbestrahlten Probe beobachtet werden. Bei Reparaturzeiten länger als 6 h nahm die Anzahl der BrdU-negativen S-Phase-Zellen bei allen bestrahlten Proben ab. Durch das Einsetzen des Checkpoints verringerte sich der Anteil der S-Phase-Zellen. Bei niedrigen Dosen innerhalb des Versuchszeitraums erfolgte ein erneuter Anstieg, was bei höheren Dosen nicht der Fall war.

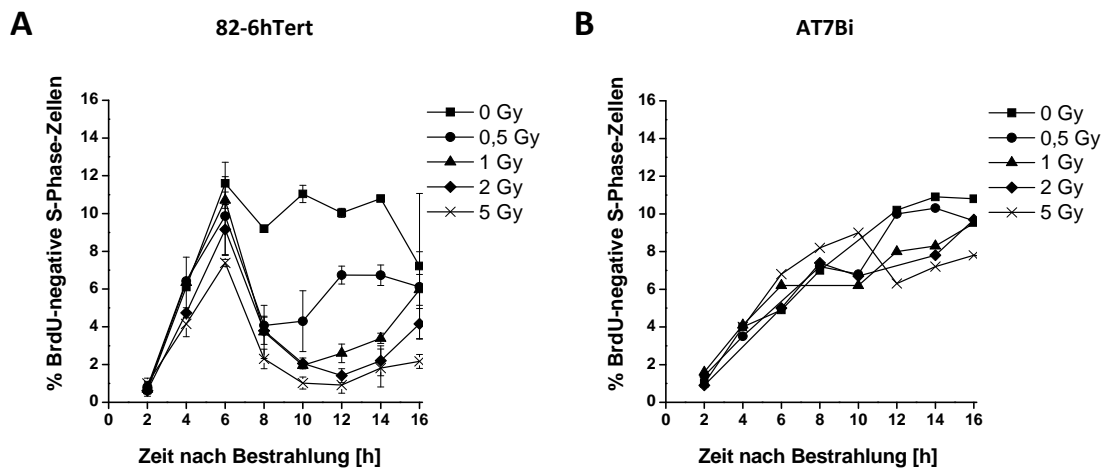


Abb. 47: Durchflusszytometrische Analyse des G1/S-Checkpoints nach IR

Exponentiell wachsende 82-6hTert- (A) und AT7Bi- (B) Zellen wurden 1 h mit BrdU pulsmarkiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy oder 5 Gy bestrahlt bzw. unbestrahlt belassen und Nocodazol zugegeben. Das Nocodazol arretiert die Zellen in der Mitose, die gezeigten Effekte stammen somit von in der G1-Phase bestrahlten Zellen. Nach Reparaturzeiten von 2 h bis 16 h wurden die Zellen fixiert und der Anteil der BrdU-negativen S-Phase-Zellen an der gesamten Zellpopulation durchflusszytometrisch bestimmt. Die BrdU-negativen S-Phase-Zellen repräsentieren die Population an Zellen, welche nach Bestrahlung in die S-Phase eintreten. Die Daten der 82-6hTert-Zellen wurden bereits in Kapitel 4.2.1 dargestellt und an dieser Stelle zum besseren Vergleich noch einmal gezeigt. Die Fehlerbalken in Graph (A) geben den Standardfehler von 4 bis 6 Messungen an.

Die unbestrahlten ATM-defizienten AT7Bi-Zellen (Abb. 47 B) zeigten in den ersten 10 h nach Bestrahlung einen stetigen Eintritt BrdU-negativer Zellen in die S-Phase. Über den weiteren Versuchszeitraum von 24 h stellte sich ein Gleichgewicht zwischen Ein- und Austritt dieser Population in die S-Phase ein, der Wert BrdU-negativer S-Phase-Zellen blieb konstant. Nach Bestrahlung zeigten die Zellen den gleichen Verlauf der Anteile BrdU-negativer Zellen wie die unbestrahlte Kontrolle, unabhängig von der Höhe der Bestrahlung. AT-Zellen dagegen initiierten keinen G1/S-Checkpoint nach Bestrahlung mit IR, was zu den Ergebnissen der EdU/BrdU-Doppelmarkierung und auch mit früheren Beobachtungen, dass der G1/S-Checkpoint nach IR abhängig von ATM ist, konsistent ist (Kastan und Lim, 2000).

Zur Untersuchung der Abhängigkeit des G1/S-Checkpoints von ATM und ATR nach UVC-Bestrahlung im Durchflusszytometer wurden die Zellen ebenso wie bei IR 1 h mit BrdU pulsmarkiert und nach Entfernung des BrdU mit 3 J/m², 6 J/m² und 12 J/m² bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen nach 2 h bis 24 h Reparaturzeit in einem Abstand von 2 h fixiert. Nach Färbung gegen BrdU wurden sie im Durchflusszytometer vermessen und der Anteil BrdU-negativer S-Phase-Zellen bestimmt.

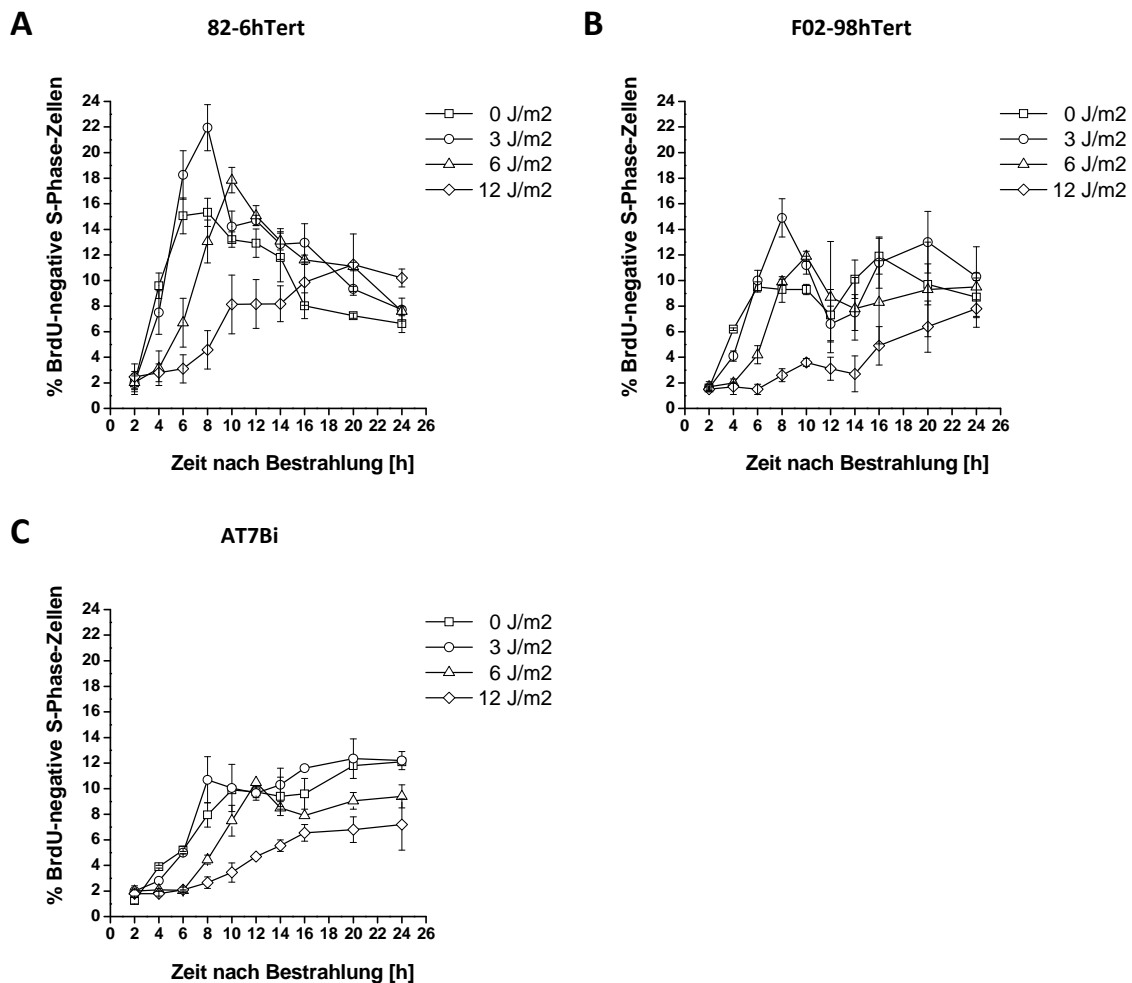


Abb. 48: Durchflusszytometrische Analyse des G1/S-Checkpoints nach UVC-Bestrahlung

Mit BrdU pulsmarkierte, exponentiell wachsende 82-6hTert- (A), F02-98hTert- (B) und AT7Bi- (C) Zellen wurden mit 3 J/m², 6 J/m² und 12 J/m² bestrahlt oder unbestrahlt belassen. Nach Bestrahlung wurde Nocodazol zugegeben, sodass die gezeigten Effekte von in der G1-Phase bestrahlten Zellen stammten. Nach Reparaturzeiten von 2 h bis 24 h wurden die Zellen fixiert, gefärbt und der Anteil der BrdU-negativen S-Phase-Zellen an der gesamten Zellpopulation durchflusszytometrisch bestimmt. Die BrdU-negativen S-Phase-Zellen repräsentieren die Population an Zellen, welche nach Bestrahlung in die S-Phase eintreten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler aus 3 bis 4 unabhängigen Messungen an.

Unbestrahlte 82-6hTert-Zellen zeigten einen schnellen Anstieg von BrdU-negativen S-Phase-Zellen ab dem Zeitpunkt 2 h bis 8 h auf 15 % BrdU-negative S-Phase-Zellen (Abb. 48 A). Danach erfolgte eine Abnahme der BrdU-negativen S-Phase-Zellen auf 8 % über einen Zeitraum von 8 h, was erneut auf eine Depletion der G1-Zellen zurückzuführen ist. Die mit 3 J/m² bestrahlten Zellen verhielten sich in den ersten 6 h nach Bestrahlung wie unbestrahlte Zellen. Nach 8 h lag das Maximum mit 22 % wesentlich höher als bei unbestrahlten Zellen. Danach erfolgte eine stetige Abnahme der BrdU-negativen S-Phase-Zellen auf 13 % nach 24 h. Wurden die Zellen mit 6 J/m² bestrahlt, zeigte sich eine Verzögerung, ein Anstieg BrdU-negativer S-Phase-Zellen konnte erst ab 4 h festgestellt werden. Auch das Maximum war um 2 h im Vergleich zu unbestrahlten Zellen verzögert und lag dann mit 18 % ebenfalls höher als bei unbestrahlten Zellen. Danach erfolgte ein stetiges Absinken bis auf 12 % nach 16 h. Noch deutlicher war die Verzögerung des Eintritts von BrdU-negativen Zellen in die S-Phase bei Bestrahlung mit 12 J/m² zu erkennen. Der Eintritt der Zellen in die S-Phase

begann erst 6 h nach Bestrahlung mit einer geringen Rate. Nach 10 h wurde ein Anteil von 8 % BrdU-negativer S-Phase-Zellen erreicht, gefolgt von einem Plateau. Danach erfolgte weiterhin ein geringer Anstieg. Einen generell ähnlichen Verlauf konnte man auch bei der Analyse der UVC-bestrahlten F02-98hTert-Zellen feststellen (Abb. 48 B). Insgesamt lagen die Werte für BrdU-negative S-Phase-Zellen etwas niedriger als bei 82-6hTert-Zellen, was auf die vergleichsweise geringe Proliferation der Zellen zurückzuführen ist. Ebenso wurde der Verlauf des Eintritts von G1-Zellen in die S-Phase in gleicher Weise bei AT7Bi-Zellen beobachtet (Abb. 48 C). Auch hier lagen die Maximalwerte unter den von 82-6hTert erreichten Werten für BrdU-negative S-Phase-Zellen.

Zusammengefasst zeigten die Experimente zu UVC-bestrahlten G1-Phase-Zellen und deren Übertritt in die S-Phase im Durchflusszytometer schon in den ersten Stunden der Messungen eine deutliche Verzögerung des Eintritts BrdU-negativer Zellen in die S-Phase. Die Länge der Verzögerung vergrößerte sich mit steigender Fluenz, danach erfolgte ein Eintritt in die S-Phase, die Rate sank ebenfalls bei Erhöhung der Fluenz. Zu späteren Zeiten setzte kein Checkpoint nach Bestrahlung ein.

Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Ergebnissen der EdU/BrdU-Doppelmarkierung nach UVC-Bestrahlung der Zellen. Während durch die Bestrahlung der Zellen mit IR zu frühen Zeiten nur eine Verzögerung des S-Phase-Eintritts zu erkennen war, zeigte sich nach Bestrahlung mit UVC ein direkter Effekt. Die Zellen treten nicht in die S-Phase ein. Zu späteren Zeiten nach IR setzte der G1/S-Checkpoint voll ein, was bei UVC-Bestrahlung nicht beobachtet werden konnte.

Bei genauerer Beobachtung der *DotPlots* der Durchflusszytometrie fiel auf, dass Zellen nach Bestrahlung langsamer durch die S-Phase liefen als unbestrahlte Zellen. Bei allen Zelllinien progressierten die Zellen der unbestrahlten Kontrolle innerhalb von 6 h von der G1-Phase durch die S-Phase bis zur G2-Phase. Bei bestrahlten Zellen war die Progression durch die S-Phase deutlich verlangsamt bzw. kam über einen bestimmten Zeitraum fast vollständig zum Erliegen.

Für die Auswertung BrdU-positiver S-Phase-Zellen wurden die Populationen in früh S/mitte S und mitte S/spät S unterteilt und die jeweiligen Anteile an Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten bestimmt (Abb. 49 A). Der Anteil der früh S/mitte S-Zellen wurde als Maß für die Progressionsgeschwindigkeit herangezogen. Zum Zeitpunkt 0 h waren die Zellen aller Zelllinien gleichmäßig in der S-Phase verteilt, womit sich jeweils 50 % S-Phase-Zellen in jedem der beiden Gates befanden (Abb. 49 B-D). Da die Zellen nur 1 h mit BrdU markiert wurden, gelangten in den folgenden Stunden keine BrdU-positiven Zellen mehr in die S-Phase. Durch die Progression der Zellen durch die S-Phase in die G2-Phase verringerte sich der Anteil von früh S/mitte S-Zellen in den folgenden Stunden. Eine Halbierung des Anteils war nach 4 h, die vollständige Depletion nach 8 h zu beobachten. Diese Verteilung der BrdU-positiven Zellen blieb auch während des Versuchszeitraums von 24 h durch die Zugabe von Nocodazol konstant - die Zellen verblieben in der G2-Phase und teilten sich nicht mehr.

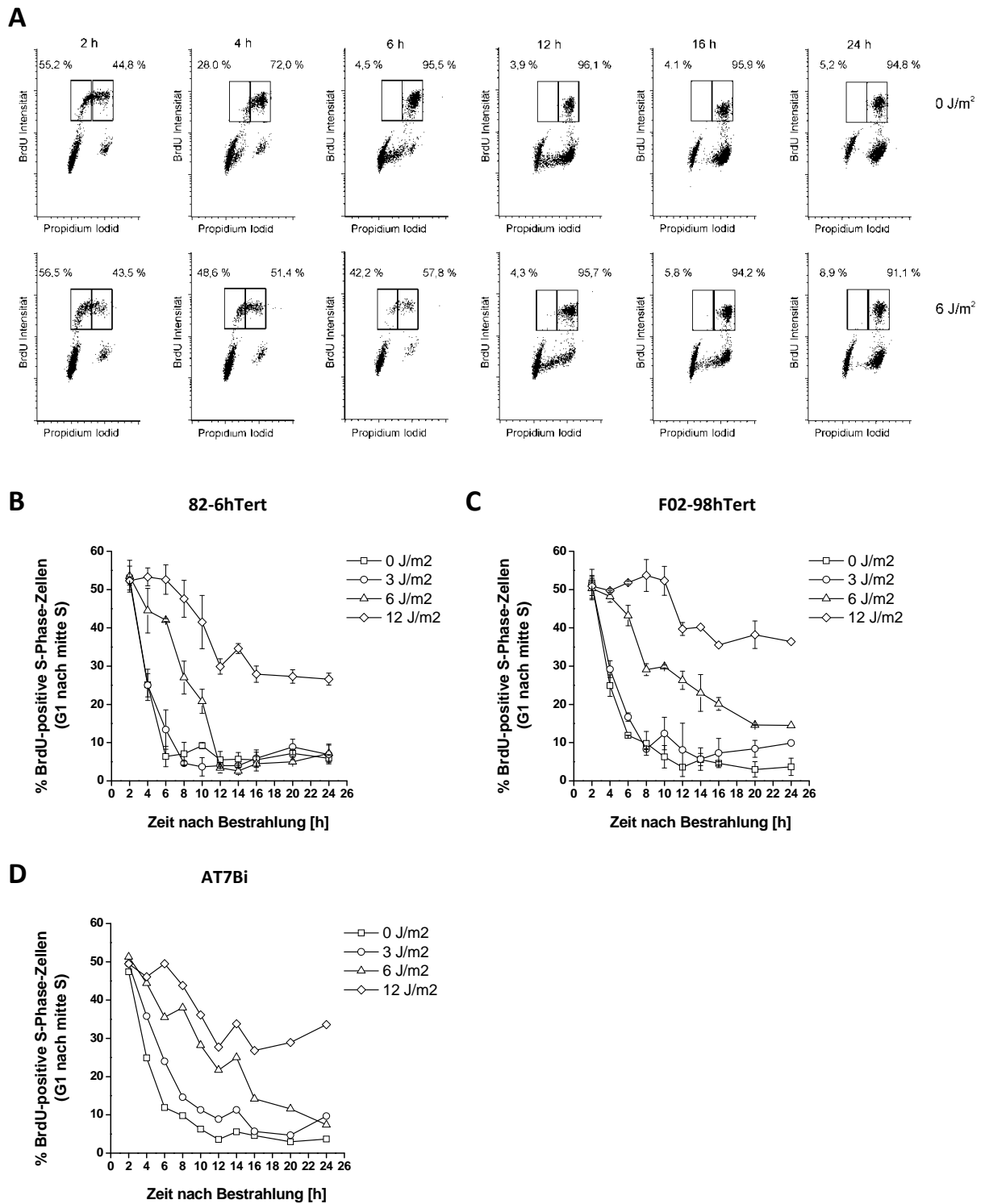


Abb. 49: Auswertung BrdU-positiver S-Phase-Zellen nach UVC-Bestrahlung mittels Durchflusszytometrie

Eine asynchron wachsende Population von 82-6hTert-Zellen wurde 1 h mit BrdU pulsmarkiert. Das BrdU wurde von den sich in der S-Phase befindlichen Zellen eingebaut. Diese Zellen wurden bei der späteren Analyse ausgewertet. Um das Fortschreiten im Zellzyklus der BrdU-positiven S-Phase-Zellen beurteilen zu können, wurden die Zellen aufgeteilt. Das linke Rechteck zeigt Zellen, welche von der frühen S-Phase bis mitte S-Phase gelangt waren. Das rechte Rechteck zeigt Zellen ab mitte der S-Phase bis zur späten S-Phase. Die Prozentwerte geben den Anteil der BrdU-positiven Zellen in der jeweiligen Kategorie an. Exemplarisch wurden *DotPlots* der unbestrahlten Kontrolle und der mit 6 J/m^2 bestrahlten 82-6hTert-Zellen zu den Zeitpunkten 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 16 h und 24 h dargestellt (A).

Die graphische Darstellung des prozentualen Anteils BrdU-positiver Zellen von 82-6hTert (B), F02-98hTert (C) und AT7Bi (D), die von früh S nach mitte S gelaufen waren, zeigte bei allen Zelllinien eine langsame Progression durch die S-Phase mit steigender Fluenz.

Durch die Bestrahlung mit 3 J/m^2 zeigten sich keine wesentlichen Veränderungen der Anteile von BrdU-positiven S-Phase-Zellen von früh S/mitte S und mitte S/spät S im Vergleich zu unbestrahlten Zellen. Deutliche Effekte wurden erst nach Bestrahlung mit 6 J/m^2 gemessen. Bis 6 h nach Bestrahlung der 82-6hTert-Zellen mit 6 J/m^2 zeigte sich eine langsame, kontinuierliche Abnahme der BrdU-positiven S-Phase-Zellen von früh S/mitte S. Die Zellen zeigten eine Verzögerung von ca. 8 h, bis das erste Gate vollständig leer war. Durch die Bestrahlung der Zellen mit 12 J/m^2 wurde in den 6 h bis 8 h nach Bestrahlung keine deutliche Abnahme der Anteile BrdU-positiver S-Phase-Zellen bei früh S/mitte S beobachtet. Erst nach 8 h verringerte sich der Anteil im ersten Gate der S-Phase, ab ca. 12 h blieb der Wert konstant bei 30 % früh S/mitte S-Zellen, ein Teil der Zellen war nicht mehr in der Lage, die S-Phase zu passieren. Die gleichen Beobachtungen wurden auch bei den Zelllinien F02-98hTert und AT7Bi gemacht. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass diese Zelllinien im Vergleich zu 82-6hTert bei höheren Fluenzen länger in der ersten Hälfte der S-Phase festgehalten wurden. Unbestrahlte Zellen verhielten sich ähnlich wie der WT, nur die Progression war insgesamt verlangsamt. Die letzten 10% der Zellen verließen das erste Gate erst nach 10 h bis 12 h. Bei Bestrahlung mit 3 J/m^2 zeigte sich kein Effekt, bei Bestrahlung mit höheren Fluenzen zeigte sich die Progression durch die S-Phase deutlich verlangsamt gegenüber unbestrahlten Zellen sowie gegenüber den entsprechend bestrahlten Proben des WT. Der Anteil von Zellen, die innerhalb von 24 h nicht weiter progressierten, stieg mit der Fluenz.

Die langsamere Progression der Zellen nach Bestrahlung könnte auf die Aktivierung von Intra-S-Phase-Checkpoints zurückzuführen sein. Dies ist konsistent mit früheren Arbeiten, welche zeigen, dass durch die Bestrahlung mit UVC Intra-S-Checkpoints aktiviert werden, im Gegensatz zur Bestrahlung mit IR (Heffernan *et al.*, 2002, Ünsal-Kacmaz *et al.*, 2007). Hier kann erst bei hohen Dosen eine leichte Verlangsamung der Progression von Zellen durch die S-Phase beobachtet werden.

Nach Bestrahlung progressierten die Zellen langsamer durch die S-Phase und wurden bei hohen Fluenzen über einen längeren Zeitraum in der S-Phase festgehalten. Beim Vergleich des Eintritts BrdU-negativer Zellen von der G1-Phase in die S-Phase und der Progression der BrdU-positiven Zellen durch die S-Phase fiel auf, dass der Zeitpunkt von S-Phase-Eintritt und Fortschreiten in der S-Phase korrelieren, was bedeutet, dass sich in der G1-Phase bestrahlte Zellen während der Progression genau so wie in der S-Phase bestrahlte Zellen verhalten. Dies deutet darauf hin, dass die Regulation des G1/S-Checkpoints nach UVC-Bestrahlung ähnlich abläuft wie die der Intra-S-Phase-Checkpoint. Es könnte zudem möglich sein, dass die Zellen nach UVC-Bestrahlung so viele Schäden an der DNA aufweisen, dass eine weitere Replikation der DNA nicht möglich ist, die Zellen nicht weiter progressieren und so der Eindruck eines Checkpoints vermittelt wird.

4.4.5 Messung des G1/S-Checkpoints in synchronisierten Zellen nach UVC-Bestrahlung

Bei allen Zelllinien konnte eine Verlangsamung von bestrahlten Zellen durch die S-Phase beobachtet werden. Dies ließ die Frage aufkommen, ob die Zellen rein physikalisch am Eintritt in die S-Phase gehindert wurden, oder ob tatsächlich ein Checkpoint aktiviert wurde. Um zu vermeiden, dass der Eintritt von Zellen in die S-Phase durch nach Bestrahlung entstandene Schäden in der S-Phase ver-

hindert wird, wurden die Zellen über Serumentzug in der G0/G1-Phase synchronisiert. So wird den Zellen nach Bestrahlung viel Zeit zur Reparatur zur Verfügung gestellt, bevor sie in die S-Phase gelangen. Neben WT-Zellen wurden auch ATR- und ATM-defiziente Zellen für die Versuche verwendet, um die Abhängigkeit des Checkpoints von ATM und ATR zu untersuchen. Desweiteren wurde ATM mit einem ATM-Inhibitor (ATMi) in allen Zelllinien inhibiert, um sich überschneidende Funktionen von ATM und ATR zu analysieren. Der ATMi wirkt als ATP-kompetitiver Inhibitor der ATM-Kinase und ist daher sehr selektiv gegenüber anderen Mitgliedern der PIKK (*Phosphatidyl Inositol 3' Kinase-related Kinases*) Familie, z.B. ATR. Er inhibiert ATM-abhängige Protein-Phosphorylierung nach ionisierender Strahlung.

Die Zellen wurden durch Serumentzug über 4 bis 5 Tage in der G0/G1-Phase synchronisiert. Zusammen mit FCS zur Stimulation der Zellen wurde EdU zur Markierung der S-Phase und zu einem Teil der Zellen ATMi gegeben. 30 min nach Stimulation der Zellen erfolgte die Bestrahlung mit 6 J/m^2 und 12 J/m^2 . Die Zellen wurden 15 min, 10 h, 12 h, 14 h, 16 h, 18 h und 24 h nach Bestrahlung fixiert und gegen EdU und γ -H2AX gefärbt. Zunächst wurde der Anteil EdU-positiver Zellen bestimmt. Da sich über den gesamten Versuchszeitraum EdU im Medium befand, wurden im Laufe der Zeit bis zu 70 % der Zellen EdU-positiv. Diese Zellen befanden sich während des Experiments in der S-Phase.

Die unbestrahlten Kontrollen synchronisierter 82-6hTert-, F02-98hTert- und AT7Bi-Zellen zeigten sowohl bei Zugabe von ATMi als auch ohne Inhibitor einen initialen Wert des Anteils EdU-positiver S-Phase-Zellen von etwa 4 %. Dieser geringe Anteil von S-Phase-Zellen spiegelt eine gute Synchronisation der Population in der G1-Phase wider. Bei allen Zelllinien fand ein erkennbares Eintreten der Zellen von der G1-Phase in die S-Phase etwa 10 h nach Zugabe des Vollmediums statt (Abb. 50 A-C). 10 h nach Zugabe des Vollmediums wurde ein leichter Anstieg der EdU-positiven Zellen in allen Zelllinien beobachtet. Ein stärkerer Anstieg bei WT-Zellen und F02-98hTert-Zellen erfolgte 12 h bis 15 h nach Serumzugabe, bei AT7Bi nach 15 h bis 18 h. Die Rate der Zellen, die im Laufe des Experiments EdU-positiv wurden, war bei allen Zelllinien sehr ähnlich. 24 h nach Stimulation wurden Anteile von 57 % bis 67 % EdU-positiver Zellen erreicht.

Bei Bestrahlung der 82-6hTert-Zellen mit 6 J/m^2 verringerte sich der Anteil EdU-positiver Zellen gegenüber der unbestrahlten Kontrolle zu allen Zeitpunkten, die Bestrahlung mit UVC bewirkte auch nach 15 h bis 24 h noch eine Verlangsamung des Eintritts von Zellen in die S-Phase. Dieser Effekt stieg mit zunehmender Fluenz.

Nach Bestrahlung der ATM-inhibierten Zellen mit 6 J/m^2 konnte ein etwas stärkerer Anstieg auf 40 % EdU-positive Zellen als ohne die Zugabe von ATMi auf 20 % EdU-positive Zellen bei der gleichen Fluenz beobachtet werden. Dies könnte auf eine Rolle von ATM nach UVC-Bestrahlung hindeuten.

Durch Zugabe von ATMi zu AT7Bi-Zellen war, wie erwartet, kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen zu erkennen. Nach Bestrahlung mit 6 J/m^2 und 24 h Reparaturzeit traten mit einem Anteil von etwa 20 % deutlich weniger G1-Phase-Zellen in die S-Phase ein als bei unbestrahlten Zellen. Bei Bestrahlung mit 12 J/m^2 wurden auch nach 24 h nicht mehr als 8 % der Zellen EdU-positiv.

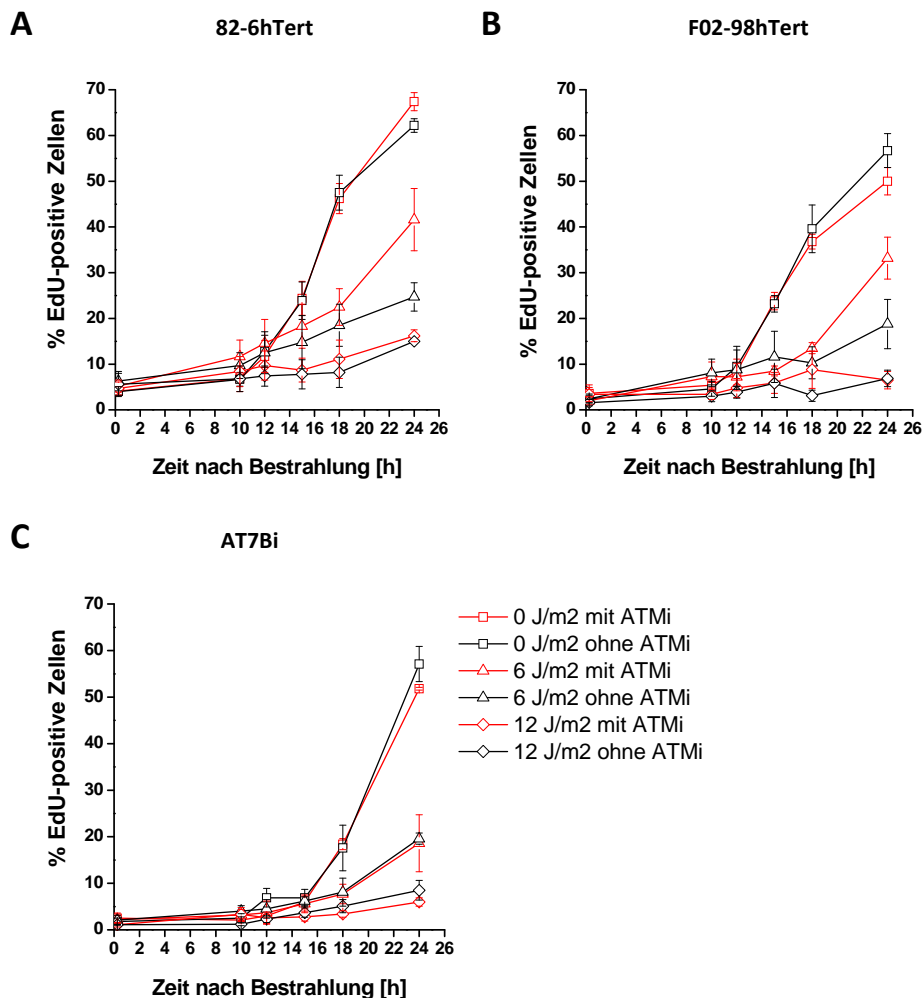


Abb. 50: Analyse des G1/S-Checkpoints in synchronisierten Zellen nach UVC-Bestrahlung und Zugabe von ATM-Inhibitor

82-6hTert-Zellen (A), F02-98hTert-Zellen (B) und AT7Bi-Zellen (C) wurden durch Zugabe von Mangelmedium (0,1 % FCS) über 4-5 Tage in der G1-Phase synchronisiert. 30 Min vor UVC-Bestrahlung erfolgte die Stimulierung zum Wiedereintritt in die G1-Phase des Zellzyklus durch Vollmedium mit 20 % FCS. Zur Markierung des S-Phase-Eintritts der G1-Zellen war dem Vollmedium 1 μM EdU beigefügt, gleichzeitig wurde 10 μM ATM-Inhibitor zu den Proben gegeben. Nach UVC-Bestrahlung mit 6 J/m² und 12 J/m² bzw. unbestrahlt belassen, wurden die Zellen nach 15 min, 10 h, 12 h, 15 h, 18 h und 24 h fixiert und gefärbt. Ausgewertet wurde der Anteil EdU-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl. Unbestrahlte Zellen zeigten in allen Zelllinien einen stetigen Eintritt in die S-Phase. Je höher die Fluenz bei Bestrahlung mit UVC, desto geringer wurde der Anteil EdU-positiver Zellen. Durch Zugabe von ATM-Inhibitor konnte bei 82-6hTert und F02-98hTert ein leichtes Aufheben des G1/S-Checkpoints nach Bestrahlung erreicht werden. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler zwischen drei unabhängigen Experimenten.

Bei F02-98hTert-Zellen unterschied sich die Rate des S-Phase-Eintritts nach ATMi-Behandlung von unbehandelten Proben im Wesentlichen nicht von der Rate der 82-6hTert-Zellen. Durch die Bestrahlung mit 6 J/m² erreichten Zellen mit ATMi nach 24 h einen Anteil von 33 % EdU-positiver Zellen, unbehandelte einen Anteil von 19 %. Wurden die Zellen mit 12 J/m² bestrahlt, erhöhten sich die Werte der EdU-positiven Zellen auch nach Zugabe des ATM-Inhibitors nur leicht auf 7 % nach 24 h. Ohne Zugabe des ATMi zu den Zelllinien traten nach Bestrahlung im Vergleich zu unbestrahlten Zellen deutlich weniger G1-Phase-Zellen in die S-Phase ein. Trotz der zur Verfügung stehenden langen Reparaturzeit erkannte man die deutliche Verzögerung des S-Phase-Eintritts. Bei allen Zelllinien waren der Zeitpunkt des S-Phase-Eintritts und die Zunahme der EdU-positiven Zellen sehr ähnlich. Aus diesem Ergebnis konnte nicht abgeleitet werden, ob ATM und/oder ATR einen signifikanten

Anteil an der Induktion des Checkpoints nach UVC-Bestrahlung haben. Nach der Inhibierung von ATM in WT-Zellen und in F02-98hTert-Zellen konnte ein verstärktes Eintreten von Zellen in die S-Phase vor allem zu späteren Zeiten beobachtet werden, dieser Effekt scheint abhängig von ATM zu sein. Interessanterweise gelingt es auch mit Inhibierung beider Kinasen nicht, den Checkpoint vollständig aufzuheben. Es besteht somit die Möglichkeit, dass weitere Proteine an der Aktivierung des Checkpoints beteiligt sind oder trotz der langen Reparaturzeit immer noch Replikations-Stress besteht.

4.4.6 γ -H2AX-Signal in synchronisierten G1-Phase-Zellen nach UVC-Bestrahlung

Die Bestrahlung mit UVC bewirkte in WT-Zellen, AT7Bi- und F02-98hTert-Zellen eine Verzögerung beim Eintritt in die S-Phase, die durch die Inhibierung von ATM in WT- und ATR-defizienten Zellen teilweise aufgehoben wurde. Die Aktivierung dieses Checkpoints scheint somit teilweise von ATM abzuhängen. Durch den Nachweis von γ -H2AX soll überprüft werden, ob nach Bestrahlung mit UVC DSBs induziert wurden.

Tab. 11: Unbestrahlte G1-Phase-Zellen

Zelllinie	G1- Zellen gesamt	% G1-Zellen mit schwachem pannukleärem Signal	% G1-Zellen mit starkem pannukleärem Signal
82-6hTert	327	1,8	0,6
F02- 98hTert	305	2,3	0,6
AT7Bi	302	3,3	0,7

Die durch Serumentzug in der G1-Phase synchronisierten Zelllinien wurden unbestrahlt belassen, fixiert und gegen EdU und γ -H2AX gefärbt. Für die Auswertung wurden je Zelllinie und Bedingung etwa 300 Zellen ausgewertet und nach den entsprechenden Kategorien in die Tabelle aufgetragen. Zellen der S-Phase wurden über die EdU-Markierung ausgeschlossen.

Tab. 12: UVC-bestrahlte G1-Phase-Zellen nach 12 J/m² und 18 h

Zelllinie	G1- Zellen gesamt	% G1-Zellen mit schwachem pannukleärem Signal	% G1-Zellen mit starkem pannukleärem Signal
82-6hTert	482	13,7	3,5
F02- 98hTert	403	5,7	0,5
AT7Bi	300	16,6	5,3

Die durch Serumentzug in der G1-Phase synchronisierten Zelllinien wurden mit 12 J/m² bestrahlt, 18 h später fixiert und gegen EdU und γ -H2AX gefärbt. Für die Auswertung wurden je Zelllinie und Bedingung etwa 300-500 Zellen ausgewertet und nach den entsprechenden Kategorien in die Tabelle aufgetragen. Zellen der S-Phase wurden über die EdU-Markierung ausgeschlossen.

Tab. 13: UVC-bestrahlte G1-Phase-Zellen nach 12 J/m² und 24 h

Zelllinie	G1- Zellen gesamt	% G1-Zellen mit schwachem pannukleärem Signal	% G1-Zellen mit starkem pannukleärem Signal
82-6hTert	428	10,7	2,1
F02- 98hTert	416	3,3	1,9
AT7Bi	292	12,0	1,7

Die durch Serumentzug in der G1-Phase synchronisierten Zelllinien wurden mit 12 J/m² bestrahlt, 24 h später fixiert und gegen EdU und γ -H2AX gefärbt. Für die Auswertung wurden je Zelllinie und Bedingung etwa 300-400 Zellen ausgewertet und nach den entsprechenden Kategorien in die Tabelle aufgetragen. Zellen der S-Phase wurden über die EdU-Markierung ausgeschlossen.

Nach Bestrahlung der Zellen mit UVC und anschließender γ -H2AX-Färbung zeigten die Zellen keine einheitliche Verteilung der Foci wie in IR-bestrahlten Zellen, mit etwa doppelt so vielen γ -H2AX-Foci in G2- als in G1-Phase-Zellen. Zur Verdeutlichung des Phosphorylierungs-Musters von H2AX befinden sich Übersichtsbilder im Anhang, Kapitel 7 (Abb. 58). Bei der Auswertung der Anzahl der γ -H2AX-Foci konnte kein deutlicher Unterschied zwischen unbestrahlten und mit 12 J/m² bestrahlten G1-Phase-Zellen festgestellt werden. Allerdings entstand nach Bestrahlung der Zellen ein pannukleäres Signal, das in einigen Zellen etwas stärker, zum Großteil aber eher schwach ausgeprägt war. In unbestrahlten WT-, AT7Bi- und F02-98hTert-Zellen lag der Anteil von Zellen mit einem schwachen pannukleären Signal bei 1,8 %, 3,3 % und 2,3 %, der Anteil der Zellen mit einem starkem pannukleärem Signal lag bei allen Zellen bei 0,6 % bzw. 0,7 %. Nach Bestrahlung mit 12 J/m² und Fixierung der Zellen nach 18 h lag der Anteil der Zellen mit schwachem pannukleärem Signal bei 13,7 % und 16,6 %, in F02-98hTert-Zellen bei 5,7 %. Die Anteile von Zellen mit starkem pannukleärem Signal lagen bei WT-Zellen bei 3,5 %, bei AT7Bi-Zellen bei 5,3 % und bei F02-98hTert-Zellen bei 0,5 %. Nach gleicher Fluenz und einer Inkubationszeit von 24 h veränderten sich die Anteile der Zellen kaum. In den ATR-profizienten Zellen 82-6hTert und AT7Bi schien der Anteil von Zellen mit pannukleärem Signal etwa drei Mal höher zu liegen, als in F02-98hTert-Zellen. Das nach Bestrahlung beobachtete flächige γ -H2AX-Signal könnte demnach zum Teil über ATR vermittelt werden. Allerdings ist der Anteil dieser Zellen in allen Zelllinien gering. Der Anteil der Zellen mit pannukleärem Signal korreliert somit nicht mit dem Anteil der in der G1-Phase arretierten Zellen.

4.4.7 Induktion des G2/M-Checkpoints nach UVC-Bestrahlung und IR

Während im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, dass der G1/S-Checkpoint nach IR erst nach mehreren Stunden vollständig aktiviert ist, ist bekannt, dass die Initiation des G2/M-Checkpoints sehr schnell erfolgt (Orren *et al.*, 1995). Weiterhin ist bekannt, dass sowohl der G1/S- als auch der G2/M-Checkpoint nach IR von ATM abhängig sind (Sancar *et al.*, 2004). Während zur Regulation des G1/S-Checkpoints nach UVC-Bestrahlung nur wenige Daten existieren, wird vom G2/M-Checkpoint angenommen, dass er nach Bestrahlung mit UVC ATM-unabhängig und ATR-abhängig ist (O'Driscoll *et al.*, 2003 und Stiff *et al.*, 2008). Um einen besseren Einblick in das *Signaling* in der G1- und der G2-Phase nach Bestrahlung mit IR und UVC zu erhalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich die

Induktion des G2/M-Checkpoints nach IR und UVC-Bestrahlung in WT-Zellen, ATM- und ATR-defizienten Zellen untersucht. Die hier erhaltenen Ergebnisse sollten auch dem Vergleich zum Einsetzen des G1/S-Checkpoints nach UVC-Bestrahlung dienen.

Die Messung des G2/M-Checkpoints erfolgte über die Bestimmung des MI durch die Färbung der Zellen gegen das phosphorylierte Serin 10 des Histons H3 (pH3). Histon H3 wird spezifisch während der Mitose phosphoryliert (Hans und Dimitrov, 2001). Unbestrahlte pH3-positive Zellen wurden als Anteil aller Zellen ausgewertet und auf 100 % normiert. IR-bestrahlte Zellen zeigten einen Rückgang pH3-positiver Zellen, da Zellen in der G2-Phase am Checkpoint arretiert wurden.

Alle drei Zelllinien wurden auf Deckgläschen ausgesät und die asynchron wachsenden Zellen mit jeweils 3 J/m², 6 J/m² oder 12 J/m² UVC oder mit 1 Gy und 2 Gy IR bestrahlt. Sofort nach Bestrahlung wurde der 0 h-Punkt fixiert, die verbleibenden Zellen wurden nach 1 h fixiert und gegen pH3 gefärbt.

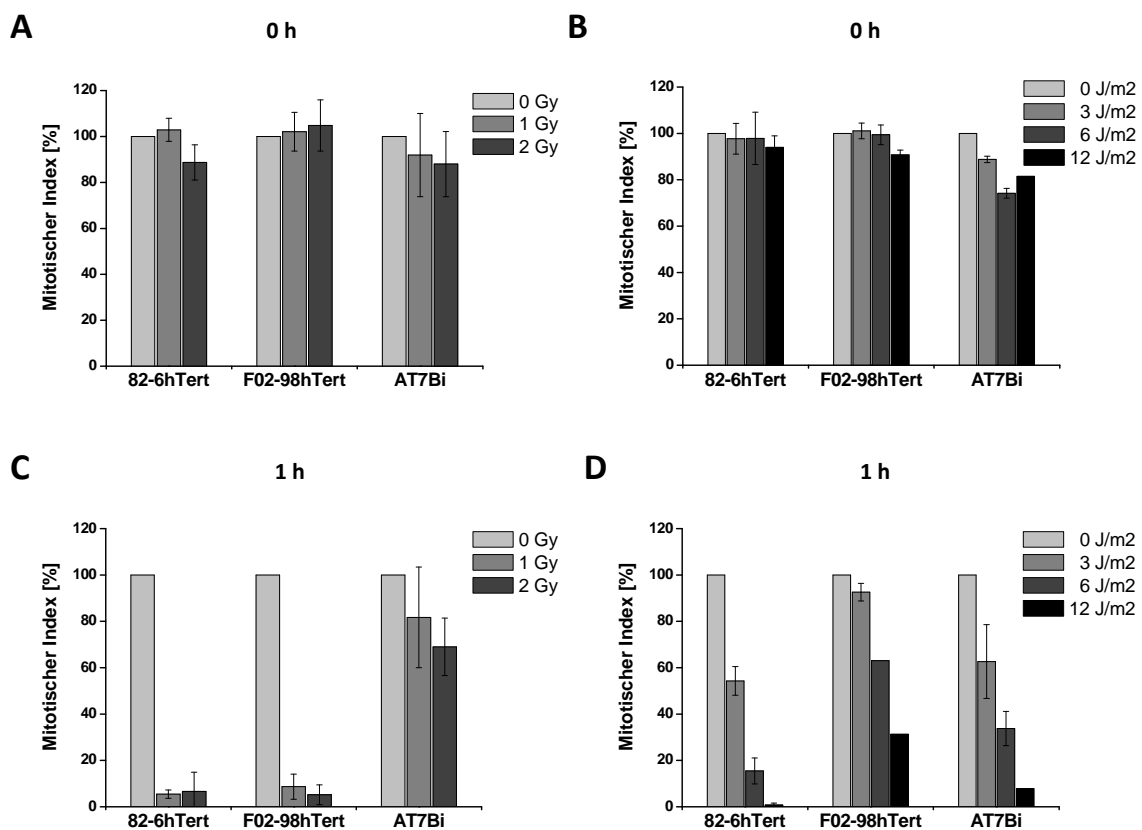


Abb. 51: Einsetzen des G2/M-Checkpoints nach IR und UVC-Bestrahlung

Zur Bestimmung des Einsetzens des G2/M-Checkpoints wurden exponentiell wachsende 82-6hTert-, F02-98hTert- und AT7Bi-Zellen mit 3 J/m², 6 J/m² oder 12 J/m² bzw. 1 Gy und 2 Gy bestrahlt oder unbestrahlt belassen. Sofort nach Bestrahlung (A und B) und nach 1 h Inkubation (C und D) wurden die Zellen fixiert und gegen phosphoryliertes Histon H3 (pH3) gefärbt. Ausgewertet wurden pH3-positive Zellen gegenüber der Gesamtzellzahl zur Bestimmung des MI. Normiert wurde jeweils auf die unbestrahlte, nach 0 h fixierte Kontrolle. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten an.

Alle Proben, die sofort nach Bestrahlung fixiert wurden, zeigten einen ähnlichen MI um 100 % (Abb. 51 A und B). Die Behandlung der Proben während des Versuchs hatte somit keinen unmittelbaren Einfluss auf die Teilungsaktivität der Zellen.

1 h nach Bestrahlung mit 1 Gy und 2 Gy besaßen die 82-6hTert- und ATM-profizienten F02-98hTert-Zellen einen MI unter 10 % im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (Abb. 51 C). Dies zeigt das Einsetzen des G2/M-Checkpoints in beiden als ATM-profizient beschriebenen Zelllinien an. Bei AT7Bi-Zellen zeigte sich nach Bestrahlung mit 1 Gy ein Rückgang auf 80 % mitotischer Zellen, bei Bestrahlung mit 2 Gy ein Rückgang auf 70 % des MI im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da ATM essentiell für die Checkpoint-Aktivierung nach Auftreten von DSBs ist. Nach Bestrahlung mit UVC ließ sich bei 82-6hTert- und AT7Bi-Zellen nach 1 h Inkubationszeit ein fluenzabhängiger Rückgang des MI feststellen (Abb. 51 D). Die Bestrahlung mit 3 J/m² ergab einen Abfall des MI auf 54 % bzw. 63 % im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle, mit 6 J/m² auf unter 16 % bzw. 34 % mitotischer Zellen. Bei Bestrahlung mit 12 J/m² sank der Wert bei 82-6hTert-Zellen auf nahezu 0 %, bei AT7Bi-Zellen auf unter 8 %. Dagegen konnte bei Bestrahlung der F02-98hTert-Zellen mit 3 J/m² kaum ein Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden. Nach Bestrahlung mit 6 J/m² fiel der Wert des MI auf knapp 63 %, bei Bestrahlung mit 12 J/m² auf 31 % im Vergleich zur Kontrolle. Nach Bestrahlung mit UVC war bei ATR-defizienten Zellen somit ein schwächeres Einsetzen des G2/M-Checkpoints als bei ATR-profizienten Zellen (82-6hTert und AT7Bi) zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass ATR tatsächlich eine Rolle bei der Aktivierung des G2/M-Checkpoints nach UVC-Bestrahlung spielt. Das Ergebnis ist konsistent mit der Beobachtung von Stiff *et al.* (2008), der das Einsetzen des G2/M-Checkpoints nach UVC-Bestrahlung in ähnlicher Form durchführte. Die Gruppe erhielt das Ergebnis, dass ATR-defiziente F02-98hTert-Zellen nach Bestrahlung mit 5 J/m² kaum einen Abfall beim MI gegenüber ATR-profizienten 1BR-Zellen zeigten. Dennoch fiel der MI bei höheren Fluenzen ab, was auf eine Restaktivität des ATR in den F02-98hTert-Zellen oder auf die Aktivierung einer alternativen Signalkaskade, die nach UVC-Bestrahlung eine Rolle spielt, zurückzuführen sein könnte.

Generell konnte dieser Versuch das Verhalten der Zellen in der Hinsicht bestätigen, dass ATR- und ATM-profiziente Zellen (82-6hTert) mit einem dosisabhängigen Rückgang des MI sowohl nach IR als auch UVC-Bestrahlung reagierten. ATM-profiziente und ATR-defiziente Zellen (F02-98hTert) reagierten mit einem starken Rückgang des MI nach IR und einem leichten Rückgang des MI nach UVC-Bestrahlung. ATR-profiziente und ATM-defiziente Zellen (AT7Bi) zeigten einen dosisabhängigen Rückgang des MI bei UVC-Bestrahlung ähnlich den WT-Zellen und einen leichten Rückgang bei Bestrahlung mit IR. Zusammengefasst zeigten diese Experimente, dass der G2/M-Checkpoint nach IR ATM-abhängig und nach UVC-Bestrahlung ATR-abhängig ist.

4.4.8 Induktion des G2/M-Checkpoints nach UVC-Bestrahlung und IR und Zugabe von ATM-Inhibitor

Nach Bestrahlung der Zelllinien mit UVC in der G2-Phase induzierten ATR-profiziente 82-6hTert- und AT7Bi-Zellen einen G2/M-Checkpoint. ATR-defiziente Zellen zeigten dagegen eine geringere Checkpoint-Induktion, was auf eine Beteiligung von ATR am Checkpoint-Signaling nach UVC-Bestrahlung hindeutet. Dass aber auch hier ein Rückgang des MI beobachtet wurde, könnte auf die Restaktivität von ATR oder auf die Beteiligung anderer Kinasen bei der Checkpoint-Induktion zurückzuführen

sein. Neben ATR ist ATM eine wichtige Kinase bei der Induktion von Checkpoint-Signalkaskaden. Daher sollte überprüft werden, ob in Abwesenheit von ATR ATM eine Rolle im Checkpoint-Signaling nach UVC spielt. ATM wurde in den folgenden Experimenten mittels ATMi inhibiert.

Das Experiment wurde in gleicher Weise wie in 4.4.7 beschrieben durchgeführt. 30 min vor Bestrahlung mit IR und UVC wurde bei einem Teil der Proben zusätzlich 10 μM ATM-Inhibitor zu den Zellen gegeben.

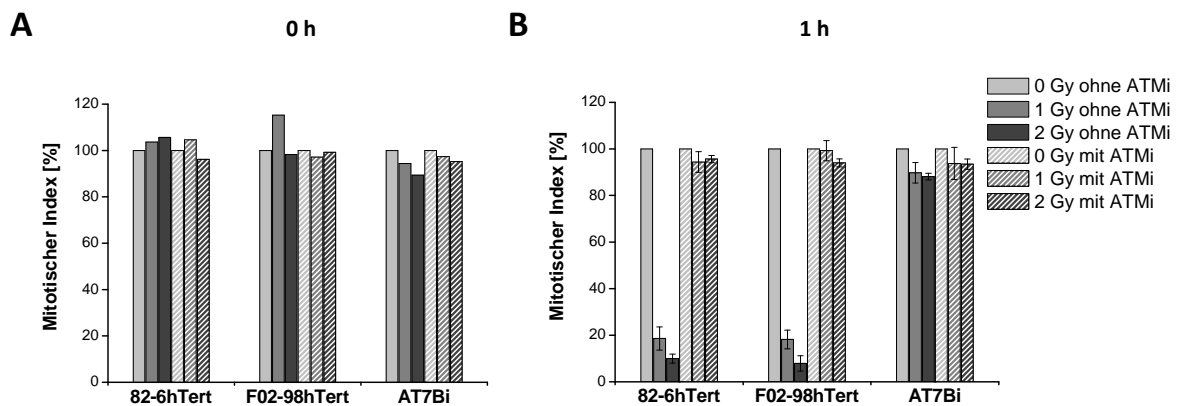


Abb. 52: Untersuchung des G2/M-Checkpoints nach ATM-Inhibitor und IR

Asynchron wachsende 82-6hTert-, F02-98hTert- und AT7Bi-Zellen wurden 30 min vor Bestrahlung mit 1 Gy und 2 Gy und ebenso die unbestrahlte Kontrolle mit ATM-Inhibitor bzw. DMSO behandelt. 0 h (A) und 1 h (B) nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und zur Bestimmung des MI gegen pH3 gefärbt. Ausgewertet wurde die Anzahl der pH3-positiven Zellen als Anteil der Gesamtzellzahl. Normiert wurde jeweils auf die unbestrahlte Kontrolle bei 0 h und 1 h mit und ohne ATMi. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus zwei Experimenten dar.

Bei Fixierung der Zellen sofort nach Bestrahlung blieb der MI in allen Zelllinien relativ konstant bei 100 % mitotischer Zellen (Abb. 52). 1 h nach Bestrahlung fiel der MI in bestrahlten 82-6hTert- und F02-98hTert-Zellen ohne ATMi erwartungsgemäß auf unter 20 % bei 1 Gy bzw. unter 10 % mitotischer Zellen bei 2 Gy IR ab. Bei AT7Bi-Zellen blieb der MI nach Bestrahlung auch ohne Zugabe des Inhibitors bei 100 %.

Während die Zugabe des ATMi auf ATM-defiziente Zellen keinen Effekt hatte, wurde die Checkpoint-Induktion in WT- und ATR-defizienten Zellen durch den ATMi aufgehoben, und der MI lag bei WT- und ATR-defizienten Zellen nach Bestrahlung bei 100 %. Durch die Zugabe des ATMi wurde der Checkpoint aufgehoben, wodurch die Funktionalität des Inhibitors bestätigt werden konnte.

Um zu untersuchen, ob eine ATM-Inhibition in Abwesenheit von ATR einen Einfluss auf das Checkpoint-Signaling nach UVC-Bestrahlung zeigt, wurden die Experimente mit UVC-Bestrahlung wiederholt (Abb. 53). Der MI aller drei verwendeten Zelllinien lag bei sofortiger Fixierung nach Bestrahlung um 100 %. Normiert wurde jeweils auf die unbestrahlte Probe mit bzw. ohne die Zugabe von ATMi. 1 h nach Bestrahlung von 82-6hTert-Zellen mit 3 J/m² war sowohl mit als auch ohne ATMi kein Effekt in Bezug auf den MI zu beobachten. Bei höheren Fluenzen nahm der MI in allen Proben ab, in Anwesenheit von ATMi war der Effekt allerdings weniger stark ausgeprägt. So lag z.B. der Wert des MI 1 h nach Bestrahlung mit 6 J/m² ohne ATMi bei 20 %, mit ATMi bei etwa 50 % mitotischer Zellen.

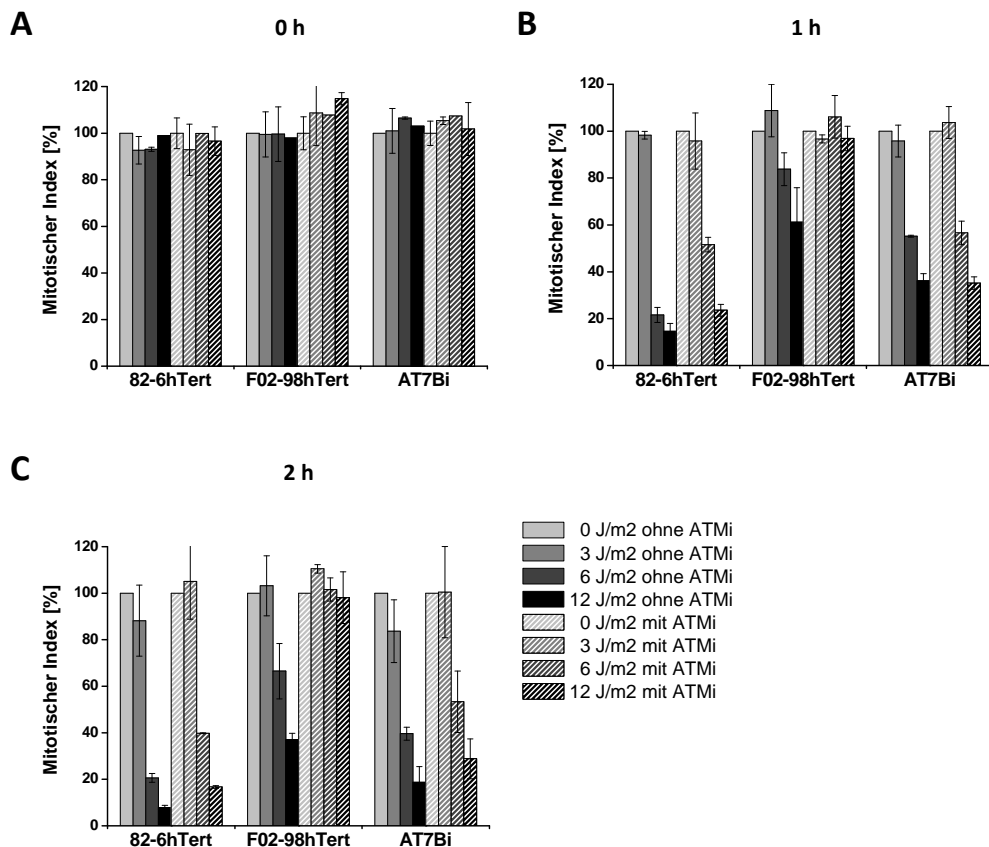


Abb. 53: Untersuchung des G2/M-Checkpoints nach ATM-Inhibitor und UVC-Bestrahlung

Asynchron wachsende 82-6hTert-Zellen, F02-98hTert-Zellen und AT7Bi-Zellen wurden 30 min vor Bestrahlung mit 3 J/m², 6 J/m² und 12 J/m² mit 10 µm ATM-Inhibitor behandelt bzw. ohne Zugabe des Inhibitors bestrahlt oder unbestrahlt belassen. Direkt nach Bestrahlung (A) bzw. nach 1 h (B) und 2 h (C) wurden die Zellen fixiert und zur Bestimmung des MI gegen pH3 gefärbt. Ausgewertet wurde die Anzahl der pH3-positiven Zellen als Anteil der Gesamtzellzahl. Die Normierung erfolgte jeweils auf die unbestrahlte Probe mit und ohne ATM-Inhibitor. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung zwischen 2 Experimenten an.

ATM-defiziente AT7Bi-Zellen zeigten sowohl mit als auch ohne Zugabe des ATMi die gleichen Tendenzen wie 82-6hTert-Zellen, welche mit Inhibitor behandelt wurden. Nach Bestrahlung mit 6 J/m² lag der MI mit und ohne ATMi bei 50 %, nach 12 J/m² bei 30 %. Ein abweichendes Verhalten wurde bei den ATR-defizienten F02-98hTert-Zellen beobachtet. Während ohne Zugabe des Inhibitors der Wert des MI 1 h nach Bestrahlung mit 6 J/m² bei 90 % und mit 12 J/m² bei 70 % lag, zeigten Proben mit ATMi und Bestrahlung mit 6 J/m² und 12 J/m² keinen Unterschied zur unbestrahlten Kontrolle, der MI lag bei 100 %. 2 h nach Bestrahlung konnten die gleichen Effekte, allerdings etwas stärker ausgeprägt, bezüglich des Absinkens des MI beobachtet werden.

Während die Zugabe des ATMi auf AT-Zellen keinen Effekt hatte, zeigten WT-Zellen nach Inhibition von ATM eine geringere Checkpoint-Induktion als ohne ATM-Inhibition. Dies deutet auf eine Beteiligung von ATM an der G2/M-Checkpoint-Induktion nach UVC-Bestrahlung hin. Interessanterweise waren ATM-inhibierte F02-98hTert-Zellen nicht mehr in der Lage, den Checkpoint auch nach höheren Fluenzen zu induzieren. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl ATM als auch ATR an der G2/M-Checkpoint-Induktion nach UVC-Bestrahlung beteiligt sind.

4.4.9 Bedeutung von γ -H2AX im Zusammenhang mit ATM und ATR und dessen Checkpoint-Funktion nach UVC-Bestrahlung

Nach Bestrahlung mit UVC wurde auch bei ATR-defizienten F02-98hTert-Zellen ein partieller G2/M-Checkpoint induziert. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt auch ATM-abhängig ist. Dieses Ergebnis war insofern überraschend, da ATM nach der Induktion von DSBs aktiviert wurde und UVC-Bestrahlung bei den hier gewählten Fluenzen keine DSBs induzieren sollte. In anderen Arbeiten wurden ebenfalls keine distinkten γ -H2AX-Foci, sondern eher ein pannukleäres Signal nach Bestrahlung mit UVC beobachtet (Marti *et al.*, 2006). Zur Überprüfung wurden γ -H2AX-Foci als Marker für DSBs ausgewertet.

Nach Bestrahlung mit UV wurden z.T. widersprüchliche Aussagen über die Phosphorylierung von H2AX generell bzw. in welcher Phase des Zellzyklus γ -H2AX vorkommt, gefunden. So besteht die Meinung, dass einzelsträngige DNA an angehaltenen Replikationsgabeln replizierender Zellen ATR rekrutiert und so die ATR-vermittelte Phosphorylierung von H2AX und Chk1 stattfindet (Ward *et al.*, 2004, Zhao *et al.*, 2010). Bei Hanasoge und Ljungman (2007) dagegen wurde eine H2AX-Phosphorylierung auch in nicht-replizierenden Zellen der G1- und G2-Phase gefunden. Zudem zeigten F02-98hTert-Zellen eine verminderte H2AX-Phosphorylierung, aber eine UVC-induzierte ATR-Aktivierung ebenfalls in nicht-replizierenden Zellen (O'Driscoll *et al.*, 2003).

Die Zählung der Foci wurde in Zellen des in Kapitel 4.4.7 beschriebenen Versuchs zum Einsetzen des G2/M-Checkpoints nach IR und UVC-Bestrahlung durchgeführt. Die Zellen waren gegen γ -H2AX und phosphoryliertes Histon H3 gefärbt, die Zellkernfärbung war mit DAPI erfolgt. Nach Einscannen der Zellen mittels Metafer-Software konnten G2-Phase-Zellen aufgrund des doppelten DNA-Gehalts von G1-Phase-Zellen unterschieden werden. Anschließend wurden die γ -H2AX-Foci in G1- und G2-Phase-Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy, 3 J/m² und 6 J/m² nach 1 h Reparaturzeit ausgezählt.

1 h nach 1 Gy lagen die Werte in den G1-Phase-Zellen von 82-6hTert- und F02-98hTert-Zellen bei etwa 25 Foci pro Zelle, bei AT7Bi-Zellen mit 18 Foci etwas niedriger. In Zellen der G2-Phase lagen die Foci-Werte von 82-6hTert-Zellen mit 50 Foci doppelt so hoch wie in G1-Phase-Zellen, F02-98hTert-Zellen lagen bei 52 Foci in der G2-Phase, AT7Bi-Zellen bei knapp unter 40 Zellen (Abb. 54). Das geringere Foci-Level in AT-Zellen könnte auf die langsamere γ -H2AX-Phosphorylierung in AT-Zellen durch DNA-PK zurückzuführen sein. Nach Bestrahlung mit 3 J/m² und 6 J/m² und Abzug der Foci der unbestrahlten Kontrolle waren sowohl in G1- als auch G2-Phase weniger als ein strahleninduzierter Focus pro Zelle detektierbar. Unter den gewählten Versuchsbedingungen induzierte die Bestrahlung mit UVC keine Foci, so dass die Beteiligung von ATM an der Induktion des G2/M-Checkpoints nicht durch die Induktion von DSBs erklärt werden kann.

Allerdings zeigte sich wiederum ein pannukleäres γ -H2AX-Muster. Übersichtsbilder zur Verdeutlichung des Phosphorylierungs-Musters befinden sich im Anhang, Kapitel 7 (Abb. 56 und Abb. 57). 2 h nach Bestrahlung zeigten sich in allen drei Zelllinien mehr Zellen mit sehr starkem pannukleärem Signal. Vermutlich handelt es sich hierbei um S-Phase-Zellen. Zudem konnte ein Anstieg der Anzahl von Zellen mit leichterem pannukleärem Signal in allen Zelllinien beobachtet werden. Hierbei handelte es sich um G1- und G2-Phase-Zellen. Bei F02-98hTert-Zellen waren die wenigsten Zellen mit hohem Hintergrund-Signal von phosphoryliertem H2AX im Gegensatz zu 82-6hTert- und AT7Bi-

Zellen zu finden. Das *Signaling* läuft möglicherweise nur bedingt über γ -H2AX-Foci ab, eine entscheidendere Rolle spielt wohl das pannukleäre Signal, wodurch ein *Signaling* über ATR vermutet wird.

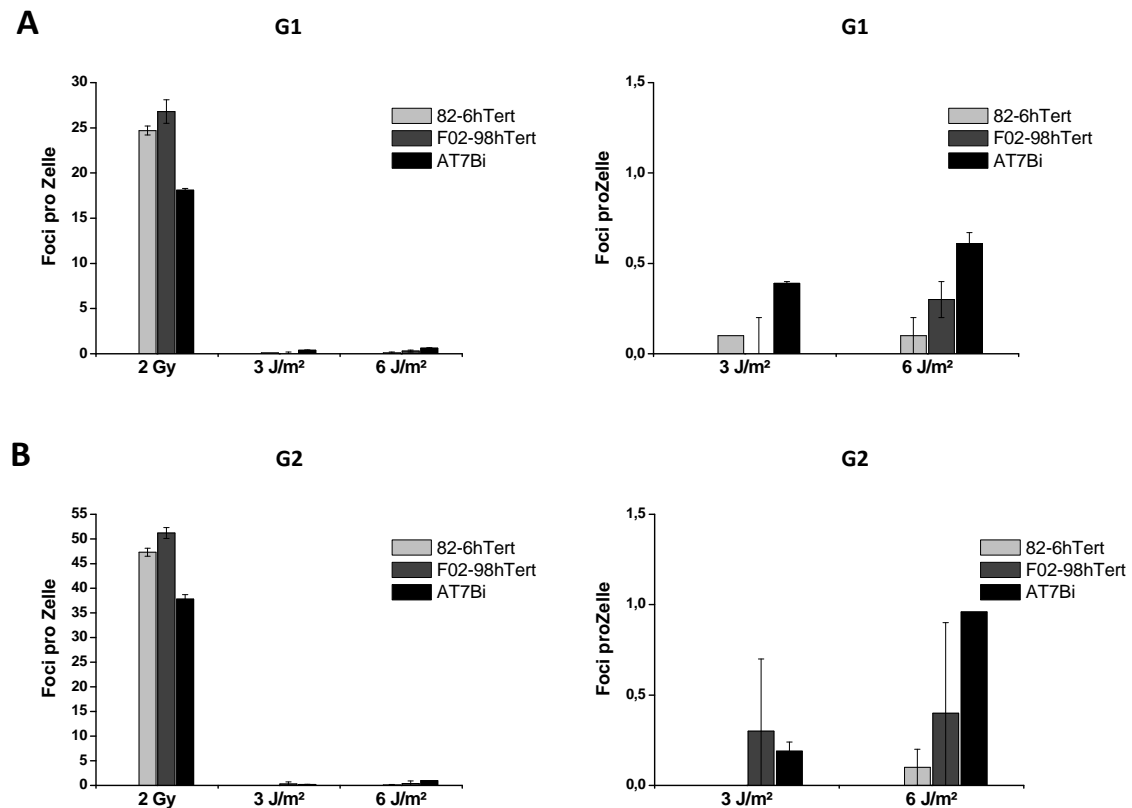


Abb. 54: γ -H2AX-Foci nach IR und UVC-Bestrahlung in der G2-Phase

Auszählung von γ -H2AX-Foci in G1-Phase-Zellen (A und B) und G2-Phase-Zellen (C und D) von 82-6hTert-, F02-98hTert- und AT7Bi-Zellen nach IR mit 2 Gy und UVC-Bestrahlung nach 1 h mit 3 J/m² und 1 h und 6 J/m² (A und C) des in 4.4.7 beschriebenen Versuchs. Die mit UVC bestrahlten Versuche wurden nochmals in einer kleineren Skalierung dargestellt (B und D). Die Zellen der Deckgläschen wurden nach Auszählung des MI mittels der Software Metafer in Bezug auf ihren DAPI-Gehalt abgescannt. Zellen mit einfachem DAPI-Gehalt wurden als G1-Phase-Zellen ausgeschlossen und in G2-Zellen mit doppeltem DAPI-Gehalt wurden die gegen γ -H2AX gefärbten Foci ausgezählt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler zwischen 3 Experimenten dar, die jeweils in den Kontrollen ausgezählten γ -H2AX-Foci wurden von den hier dargestellten Werten abgezogen.

Die Bestrahlung der Zelllinien 82-6hTert (ATR- und ATM-profizient), F02-98hTert (ATR-defizient und ATM-profizient) und AT7Bi (ATR-profizient und ATM-defizient) mit IR zeigte bei 82-6hTert und F02-98hTert einen schnell einsetzenden ATM-abhängigen G2/M-Checkpoint. Nach UVC-Bestrahlung schienen ATM und ATR beim Einsetzen des G2/M-Checkpoints eine Rolle zu spielen. Da selbst nach Bestrahlung mit höheren Fluenzen keine Erhöhung der γ -H2AX-Foci erkennbar war, könnte ATM über andere Signalwege, wie beispielsweise ein pannukleäres Signal, aktiviert werden. Der G1/S-Checkpoint setzt nach Bestrahlung mit UVC direkt ein, wobei der Einfluss von ATR nicht nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise spielt auch hier ATM in Abwesenheit von ATR eine Rolle bei der Induktion des Checkpoints. Nach Zugabe von ATMi konnte der Checkpoint in F02-98hTert-Zellen nicht vollständig aufgehoben werden, was für die Beteiligung weiterer Proteine außer ATM und ATR am G1/S-Checkpoint spricht.

5 Diskussion

Die korrekte Regulation des Zellzyklus ist von größter Wichtigkeit für die Erhaltung der genomischen Integrität und für die Vermeidung der Tumorentstehung durch entartete Zellen. Mittlerweile ist eine Vielzahl von Genen bekannt, durch deren Mutationen die genetische Stabilität beeinträchtigt und die Krebsentstehung begünstigt wird. Diese Gene kodieren zum einen für Protoonkogene wie Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (Cdks) (Vermeulen *et al.*, 2003), welche das Fortschreiten der Zellen im Zellzyklus vorantreiben, zum anderen für Tumorsuppressorproteine, welche v.a. den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase oder von der G2-Phase in die Mitose kontrollieren. Die Mutation von Protoonkogenen zu Onkogenen kann zu einer Überexpression dieser Proteine führen, wodurch sich die Zellen auch in Abwesenheit externer Signale immer weiter teilen (Collins *et al.*, 1997). An der Regulation von Checkpoints sind Tumorsuppressorproteine beteiligt, zu denen unter anderem p53, p21 und pRb (Retinoblastomproteine) zählen. Bei einer Mutation erfolgt ein Funktionsverlust dieser Proteine, wodurch z.B. nach DNA-Schädigung die Progression durch den Zellzyklus nicht mehr unterbunden wird und Zellen mit DSBs nicht mehr zur Reparatur ihrer Schäden im Zellzyklus arretieren. Krebszellen zeigen daher im Allgemeinen einen deregulierten Zellzyklus. Damit die Mutation solcher Gene von Anfang an unterbunden wird, aktiviert die Zelle nach DNA-Schädigung wie sie auch nach IR auftritt, verschiedene Schadensantworten. So wird unter anderem der Zellzyklus an definierten Punkten, dem G1/S- oder G2/M-Checkpoint angehalten, um der Zelle Zeit zu geben, DNA-Schäden vor Eintritt in die nächste Zellzyklus-Phase zu reparieren. Ist der Schaden zu schwerwiegend, wird die Apoptose eingeleitet.

5.1 Untersuchung des G1/S-Checkpoints nach IR

Die Signalkaskaden, die nach DNA-Schädigung zur Aktivierung der Checkpoints führen, wurden biochemisch bereits gut charakterisiert, über das Zusammenspiel zwischen Zellzyklus-Kontrolle und DNA-Reparatur auf zellulärer Ebene ist jedoch weniger bekannt. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit die zeitliche Regulation und die Sensitivität des G1/S-Checkpoints in Bezug auf die Anzahl der DSBs beim Einsetzen und Aufheben des Checkpoints untersucht werden. Die zeitliche Regulation des Checkpoints nach IR wurde mit klassischen Methoden wie der Durchflusszytometrie und der Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Weiterhin wurde die Methode des *Live Cell Imagings* etabliert, um Limitierungen der klassischen Methoden zu begegnen. Diese Aspekte wurden mit IR als DSB-induzierendem Agens und im weiteren Verlauf der Arbeit mit UVC-Bestrahlung, welche vornehmlich Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs), 6-4-Photoprodukte (6-4PPs) und Einzelstrangbrüche (ESBs) an der DNA verursacht, untersucht.

5.1.1 Untersuchungen zum Einsetzens des G1/S-Checkpoints

Für die Untersuchung des G1/S-Checkpoints sollte ein passendes, Checkpoint-profizientes und gut proliferierendes Zellsystem gewählt werden. Primäre Zellen aus Biopsien gesunder Spender zeigen zwar keine Mutationen und genomische Auffälligkeiten, ihre Lebensdauer ist jedoch begrenzt und die Proliferationsrate niedrig. Tumorzellen oder Zellen, die zur Immortalisierung z.B. mit SV40 (Simian Virus 40) transfiziert wurden, besitzen hingegen die Fähigkeit, sich unbegrenzt mit einer hohen Proliferationsrate zu teilen. Allerdings zeigen solche Zellen oft Defekte in Genen, die für die Zellzyklusregulation eine Rolle spielen, und scheiden daher für Untersuchungen des G1/S-Checkpoints aus. Schließlich schienen hTert-transfizierte Zellen ein geeignetes Zellsystem für die Beobachtung der Checkpoint-Aktivierung darzustellen. Um die Lebensdauer und die Proliferationsrate zu verbessern, wurden in diesem Fall primäre Zellen mit einem Vektor transfiziert, der für die katalytische Untereinheit der *human Telomerase reverse transcriptase* (hTert) codiert. Primäre humane Zellen erreichen nach wenigen Zellteilungen ein Stadium, welches als replikative Seneszenz bezeichnet wird und auf der Verkürzung der Telomere beruht. Diesem Prozess wird durch die Immortalisierung mit dem hTert-Vektor entgegen gewirkt (Bodnar *et al.*, 1998). Die hTert-immortalisierten Zellen besitzen einen stabilen Karyotyp und entwickeln weder spontan noch nach Bestrahlung eine genomische Instabilität (Sharma *et al.*, 2003). Die hier verwendeten Zelllinien 82-6hTert und 2BNhTert sind Checkpoint-profizient, proliferieren gut und waren daher für Checkpoint-Analysen geeignet. Die WT-Zelllinie 82-6hTert zeigt keine Defekte, XLF-defiziente 2BNhTert-Zellen besitzen einen Defekt im Ligationsschritt des DSB-Reparaturweges des NHEJ und zeigen demnach einen massiven Reparaturdefekt (Dai *et al.*, 2003).

Obwohl biochemisch gut beschrieben, wurde bisher keine genauere zeitliche Charakterisierung des Einsetzens des G1/S-Checkpoints vorgenommen. So sollte in dieser Arbeit der zeitliche Aspekt des Einsetzens des G1/S-Checkpoints auf zellulärer Ebene mit verschiedenen Methoden untersucht werden. Um eine Einschätzung der zeitlichen Regulierung des G1/S-Checkpoints nach steigenden Dosen IR zu erhalten, wurde der Zellzyklus von bestrahlten im Vergleich zu unbehandelten exponentiell wachsenden Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Diese Methode bot vor allem den Vorteil, eine große Anzahl von Zellen analysieren zu können und somit eine gute statistische Grundlage der Ergebnisse zu erhalten.

WT-Zellen und XLF-defiziente Zellen wurden vor der Bestrahlung zunächst für 1 h mit BrdU pulsmarkiert, welches während dieser Zeit von den replizierenden Zellen der S-Phase in die DNA eingebaut wurde. Auf diese Weise konnten BrdU-positive Zellen bei der späteren Auswertung ausgeschlossen werden, da nur Zellen untersucht werden sollten, die in der G1-Phase des Zellzyklus bestrahlt wurden. Unbestrahlte BrdU-negative G1-Phase-Zellen progressierten beständig in die S-Phase, bis ein Gleichgewicht zwischen ein- und austretenden Zellen erreicht war. Bestrahlte WT-Zellen zeigten in den ersten 6 h nach Bestrahlung die gleiche kontinuierliche Progression in die S-Phase wie unbestrahlte Zellen (Abb. 33). Dabei konnte eine leichte, dosisabhängige Verzögerung beim Eintritt beobachtet werden. Bei XLF-defizienten Zellen war die dosisabhängige Verlangsamung des S-Phase-Eintritts deutlicher ausgeprägt als bei WT-Zellen. Dies könnte auf den Reparaturdefekt

von XLF-defizienten Zellen zurückzuführen sein. Der Ligationsschritt der DNA-Reparatur dieser Zellen ist beeinträchtigt und so werden DNA-Schäden langsamer als in WT-Zellen repariert. Obwohl die Bestrahlungsdosen an den Defekt der Zellen angepasst und nur mit etwa 10 % der Dosis der WT-Zellen bestrahlt wurde, könnte sich ein höheres Schadenslevel zeigen und der Eintritt der Zellen in die S-Phase wurde dadurch etwas stärker als bei WT-Zellen am G1/S-Checkpoint verzögert. Doch selbst diese Zellen wurden in den ersten 6 h nach Bestrahlung nicht in der G1-Phase festgehalten. Somit konnte zunächst ausgeschlossen werden, dass WT-Zellen deshalb nicht in den ersten 6 h nach Bestrahlung in der G1-Phase festgehalten werden, weil sie die DSBs schneller reparieren als die Mutante. Erst 6 h nach Bestrahlung wurden keine neu in die S-Phase eintretenden Zellen mehr detektiert und daher vermutet, dass nun der G1/S-Checkpoint aktiviert wurde. Mit dieser Methode konnte ein vollständiges Einsetzen des G1/S-Checkpoints nach ca. 6 h nach IR beobachtet werden.

Die Methode der Durchflusszytometrie besitzt allerdings den Nachteil, dass S-Phase-Zellen über ihren DNA-Gehalt von G1- und G2-Phase abgegrenzt werden. Dies ist anhand der *DotPlots* erst nach einigen Stunden möglich, wenn die Zellen genügend DNA synthetisiert haben, um eindeutig von der G1-Phase diskriminiert werden zu können. Daher wurde zur Verifizierung des Ergebnisses eines langsam einsetzenden G1/S-Checkpoints der Eintritt von G1-bestrahlten Zellen in die S-Phase zusätzlich über andere Methoden bestimmt. Dazu wurde eine Methode etabliert, mit der unabhängig von der DNA-Synthese S-Phase-Zellen detektiert werden können. Die Zellen wurden nach Bestrahlung mit einem Antikörper gegen PCNA gefärbt. Durch die Lokalisation von PCNA an den Replikationsgabeln bildet sich während der Replikation in S-Phase-Zellen ein charakteristisches Muster aus, wodurch sie bei mikroskopischer Auswertung von flächig gefärbten Zellen der G1- und G2-Phase unterschieden werden können. Die Abnahme der S-Phase-Population konnte in diesem Ansatz mit 4 h bis 6 h früher als bei der durchflusszytometrischen Analyse beobachtet werden. Weiterhin bietet diese Methode die Möglichkeit, gezielt Zellen der frühen, mittleren und späten S-Phase durch unterschiedliche zeitliche Replikation verschiedener Chromatinregionen und somit Änderung des Musters im Verlauf der S-Phase unterscheiden zu können (Abb. 37). Durch die Quantifizierung der frühen S-Phase-Zellen konnte das Einsetzen des G1-Arrestes schon 2 h früher als bei der durchflusszytometrischen Analyse, also nach 4 h, beobachtet werden. Eine leichte Verzögerung des S-Phase-Eintritts mit zunehmender Dosis konnte ebenfalls aufgezeigt werden. Bei diesem Ansatz wurde deutlich, dass zu frühen Zeiten nach Bestrahlung zunächst die Anzahl der frühen S-Phase-Zellen, dann die der mitte S-Phase-Zellen und schließlich die der späten S-Phase-Zellen abnimmt.

Die Verzögerung des S-Phase-Eintritts und ein Einsetzen des Checkpoints nach 4 h, wurden auch bei der Methode der Doppelmarkierung mit EdU und BrdU beobachtet. Dieser Ansatz über Immunfluoreszenz-Mikroskopie sollte sensitiver als die Durchflusszytometrie sein, da Markierungen mit EdU und BrdU schon nach kurzen Einbauzeiten nachgewiesen werden können (Abb. 39). Die zusätzliche Zeit für DNA-Synthese zur Unterscheidung der S-Phase von der G1-Phase wie in der Durchflusszytometrie war bei dieser Methode somit nicht nötig. Bei allen bisherigen mit fixierten Zellen durchgeführten Methoden konnte ein Einsetzen des Checkpoints zwischen 4 h und 6 h beobachtet werden.

Ein Ansatz, bei dem die Zellen zur Auswertung nicht mehr fixiert werden, ist die Bestimmung des G1/S-Übergangs in lebenden Zellen mittels *Live Cell Imaging*. Hierbei wurden lebende Zellen mit dem Konstrukt RFP-LigaseI transfiziert, wodurch bei Eintritt in die S-Phase ein spezifisches Muster wie auch bei der Färbung mit PCNA-Antikörpern detektiert werden kann. PCNA dient bei der Replikation der DNA als *loading*-Plattform, unter anderem auch für die DNA-LigaseI. DNA-LigaseI verknüpft bei der diskontinuierlichen DNA-Replikation die Okazaki-Fragmente. Beide Proteine befinden sich daher während der Replikation am selben Ort. Bei dieser Methode wurde das Einsetzen des G1/S-Checkpoints nach Bestrahlung mit 1 Gy 6 h nach Bestrahlung beobachtet (Abb. 25). Möglicherweise progressierten die Zellen nach Transfektion mit den GFP- und RFP-gekoppelten Plasmiden und Aufnahme im LCI-System langsamer als bei den zuvor genannten Methoden. Somit wäre es möglich, dass auch G1-Phase-Zellen mehr Zeit benötigten, um den G1/S-Checkpoint zu aktivieren und die Zeit bis zum Einsetzen des Checkpoints somit verlängert wurde.

Bei allen Methoden, mit Ausnahme des LCI wurde selbst nach Bestrahlung mit hohen Dosen in den ersten Stunden nur eine leichte Verzögerung des S-Phase-Eintritts der Zellen beobachtet. Alle verwendeten Methoden zeigten ein langsames Einsetzen des Checkpoints zwischen 4 h und 6 h nach Bestrahlung.

Einleitung des G1/S-Checkpoints

Das in dieser Arbeit gemessene langsame Einsetzen des G1/S-Checkpoints ist konsistent mit einer Beobachtung von Linke *et al.* (1997) die sich auf eine Population humaner Fibroblasten bezieht, welche in den ersten Stunden nach Bestrahlung wie unbestrahlte Zellen in die S-Phase progressieren. Die Autoren interpretieren dieses schnelle Übertreten in die S-Phase nach Bestrahlung dahingehend, dass vorhandene DSBs schnell und effizient repariert wurden und die Zellen daher nicht mehr am Checkpoint festgehalten werden mussten. Allerdings wurden keine DSB-Reparatur-Messungen durchgeführt, die diesen Umstand belegen könnten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bestrahlte Zellen zu frühen Zeiten trotz einer großen Anzahl von DSBs in die S-Phase eintreten (Deckbar *et al.*, 2010). Lange *et al.* (2004) wiesen nach γ -Bestrahlung menschlicher Amnionzellen mit 2 Gy, 4 Gy und 8 Gy über Auswertung der Zellzyklus-Verteilung im Durchflusszytometer einen G1/S-Checkpoint nach, der 6 h nach Bestrahlung eine Verringerung der S-Phase-Zellen auf die Hälfte der Kontrolle und nach 12 h nur noch einen geringen Anteil an S-Phase-Zellen zeigte. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 30 h alle 6 h fixiert, weshalb man keine Aussagen über das Verhalten in den ersten 6 h nach Bestrahlung erhält. Die Abnahme der S-Phase-Zellen, als Maß für das Einsetzen des Checkpoints, 6 h nach Bestrahlung spricht dafür, dass der Checkpoint zu diesem Zeitpunkt bereits eingesetzt hat. Einen genaueren Zeitrahmen des Einsetzens des G1/S-Checkpoints konnten Gadbois und Lehnert (1997) nach 2 Gy γ -Bestrahlung von Lungenfibroblasten festlegen. Die Zellen wurden hierbei ähnlich wie in dieser Arbeit mit BrdU markiert und im Durchflusszytometer vermessen. Konsistent mit den Beobachtungen dieser Arbeit konnte bereits 4 h nach Bestrahlung eine Verringerung der BrdU-negativen S-Phase, nach 6 h ein volles Einsetzen des Checkpoints gemessen werden. Loignon und Drobetsky (2002) bestrahlten asynchrone Fibroblasten nach 2-stündiger BrdU-Markierung mit 5 Gy und beobachteten, dass Zellen

über einen Zeitraum von 6 h ungehindert, wie unbestrahlte Zellen in die S-Phase progressierten. 6 h nach Bestrahlung manifestierte sich eine klare Hemmung des S-Phase-Eintritts über einen Zeitraum von 24 h. Diejenigen Zellen, die in den ersten 6 h nach Bestrahlung in die S-Phase gelangten, wurden einer Subpopulation von G1-Phase-Zellen zugeordnet, welche einen bestimmten Punkt im Zellzyklus zum Zeitpunkt der Bestrahlung bereits passiert hatten und zwangsläufig in die S-Phase progressierten. Diese Beobachtungen stimmen mit den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen sehr gut überein.

Die sowohl in dieser Arbeit als auch in anderen Arbeiten nachgewiesene kontinuierliche Progression der Zellen von der G1-Phase in die S-Phase in den ersten 6 h nach Bestrahlung widerspricht dem Modell, dass ein über DSBs induzierter G1/S-Checkpoint transient aktiviert wird, um den Zellen genügend Zeit zur Verfügung zu stellen, ihre DSBs vor Eintritt in die S-Phase zu reparieren (Kastan *et al.*, 1991, Suzuki *et al.*, 2006, Iwamoto *et al.*, 2008). Vielmehr scheinen die Zellen in den ersten 6 h nach Bestrahlung keiner effektiven Checkpoint-Kontrolle zu unterliegen. Die Daten dieser Arbeit zeigten in den ersten Stunden nach Bestrahlung nur eine leichte dosisabhängige Verlangsamung des S-Phase-Eintritts, aber keinen vollständigen Arrest.

Parallel zu dieser Arbeit wurden von unserem Partnerlabor (P. A. Jeggo, University of Sussex) im Rahmen derselben Studie Analysen des G1/S-Checkpoints durchgeführt. Zunächst wurde in verschiedenen Experimenten die genetische Abhängigkeit der schnellen Schadensantwort nach Bestrahlung untersucht. Diese Studien wurden in durch Serumentzug in G0/G1 synchronisierten hTert-Fibroblasten durchgeführt. Zellen wurden 8,5 h nach Stimulation mit FCS, ca. 1,5 h vor Eintritt der Zellen in die S-Phase bestrahlt. Zu frühen Zeiten wurde eine dosisabhängige Verlangsamung der markierten S-Phase-Zellen mit anschließendem Checkpoint-Arrest 10 h nach Bestrahlung gemessen. AT-defiziente Zellen und Zellen, in denen Chk2 herunterreguliert war, zeigten hingegen nach Bestrahlung keine Verlangsamung. Dies deutet darauf hin, dass eine Abhängigkeit dieser frühen Schadensantwort von ATM besteht. Durch die Herunterregulierung von p53 durch siRNA traten unbestrahlte Zellen früher in die S-Phase ein als mit Kontroll-siRNA behandelte Zellen. Nach Bestrahlung konnte keine signifikante Verzögerung der mit p53-siRNA-behandelten Zellen beim Eintritt in die S-Phase beobachtet werden, im Gegensatz zu Zellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden. Dies deutet darauf hin, dass p53 nicht bei der schnellen Schadensantwort involviert ist. Die schnelle Schadensantwort wird somit über einen p53-unabhängigen Weg durch die Phosphorylierung von ATM und Chk2 reguliert.

Bereits in früheren Arbeiten wurde die Signalkaskade eines über ATM-Chk2-Cdc25A einsetzenden G1/S-Checkpoints gezeigt und beschrieben (Matsuoka *et al.*, 1998, Kastan und Lim, 2000, Falck *et al.*, 2001). Cdc25A wird vor allem in der späten G1-Phase exprimiert und entfernt inhibierende Phosphatgruppen von CyclinE/Cdk2 Ende der G1-Phase bzw. CyclinA/Cdk2 in der frühen S-Phase (Jinno *et al.*, 1994). Hoffmann *et al.* (1994) berichten, dass Cdc25A essentiell für den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase ist, denn bei Mikroinjektion von anti-Cdc25A-Antikörpern in G1-Zellen, die zur Inhibierung von Cdc25A führen, wird die Progression in die S-Phase blockiert. Nach Bestrahlung erfolgt die Degradierung von Cdc25A. Die inaktivierende Phosphorylierung von Cdk2 wird in der Folge nicht mehr entfernt, somit kann Chk2 Cdc45 nicht mehr phosphorylieren, wodurch die

Replikation nicht eingeleitet wird (Deckbar *et al.*, 2010). Die initiale, transiente DSB-Antwort wird als sehr schnell beschrieben. Sie führt innerhalb von 20 bis 30 min zur Inhibierung von Cdk2 und dauert nur wenige Stunden an (Bartek und Lukas, 2001). Interessanterweise führt die schnelle Aktivierung der Signalkaskaden nicht zur Inhibierung der Proliferation. Möglicherweise sind Faktoren unterhalb der Cdks involviert, die nicht direkt inhibiert werden können.

Aufrechterhaltung des G1/S-Checkpoints

Nach der schnellen, p53-unabhängigen Schadensantwort folgt ein spätes, vollständiges Einsetzen des Checkpoints. Im Rahmen dieses Projekts unseres Labors und des Partnerlabors von P. A. Jeggo wurde die genetische Abhängigkeit dieser späten Schadensantwort untersucht (Deckbar *et al.*, 2010). Hierbei wurde gezeigt, dass die späte Antwort ATM- und p53-abhängig, aber unabhängig von Chk1 und Chk2 ist. Durch die Identifizierung der beteiligten Proteine konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei der früh nach Bestrahlung zeigenden Verlangsamung des S-Phase-Eintritts um einen anderen Signalweg handelt als beim später einsetzenden Checkpoint.

Die p53-Abhängigkeit einer spät einsetzenden Checkpoint-Antwort ist konsistent mit Beobachtungen von Kastan *et al.* (1992). So konnte in humanen Fibroblasten eine Induktion von p53 und ein Einsetzen des Checkpoints nachgewiesen werden. Nach IR von normalen humanen Fibroblasten mit 1,5 Gy wurde innerhalb von 6 h bis 8 h ein Einsetzen des Checkpoints beobachtet (Zhou *et al.*, 2006, Kaufmann *et al.*, 2003). Der Zeitrahmen bis zum Einsetzen des Checkpoints deckt sich in etwa mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Allerdings wiesen Di Leonardo *et al.* (1994) in asynchronen humanen Fibroblasten nach 4 Gy bis 6 Gy γ -Bestrahlung erst zwischen 16 h und 48 h eine Abnahme von S-Phase-Zellen nach. Die verlängerte Zeit bis zum Einsetzen des G1/S-Checkpoints könnte mit einer langsamen Proliferationsgeschwindigkeit der verwendeten Fibroblasten oder Unterschieden bei der Behandlung der Zellen in Zusammenhang stehen. So wurden die Zellen beispielsweise bei 7 % CO₂ inkubiert, in den Experimenten dieser Arbeit wurden die Zellen standardmäßig bei 5 % inkubiert. Auch Attardi *et al.* (2004) wiesen einen p53-abhängigen G1/S-Checkpoint nach 18 h in asynchron wachsenden primären MEF (*Mouse Embryonal Fibroblasts*)-Zellen nach 5 Gy γ -Bestrahlung nach. Dieser Zeitraum liegt erheblich über den hier gemessenen 4 h bis 6 h zum Einsetzen des Checkpoints. Möglicherweise spielt hier das murine Zellsystem eine Rolle oder die Zellen waren bereits tot.

In der Literatur existieren unterschiedliche Aussagen zum Einsetzen des p53-abhängigen G1/S-Checkpoints. Viele Studien zum Checkpoint-Verhalten wurden in humanen Fibroblasten (z.B. Linke *et al.*, 1997) oder murinen Zellen durchgeführt, einige jedoch explizit in Tumorzellen zur Überprüfung der Bedeutung des p53-Status bei der G1/S-Checkpoint-Induktion. In humanen Fibrosarcom-Zellen mit p53-WT Status konnte von Pellegata *et al.* (1996) 8 h nach γ -Bestrahlung mit 4 Gy ein G1/S-Checkpoint nachgewiesen werden, in der selben Zelllinie mit mutiertem p53 unter den gleichen zuvor genannten Bedingungen war dies nicht der Fall. Nagasawa *et al.* (1998) stellten fest, dass nicht nur der p53-Status über das Einsetzen des G1/S-Checkpoints, sondern auch die Herkunft der einzelnen Tumorzelllinien darüber entscheidet. Im Falle der Tumorzellen können neben p53

auch andere Komponenten der Zellzyklus-Kontrolle Mutationen aufweisen und der Checkpoint setzt aufgrund dessen nicht ein.

In dieser und anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass ein vollständiges Einsetzen des p53-abhängigen Checkpoints nach 4 h bis 6 h nach IR erfolgte. Das vollständige Einsetzen erst nach mehreren Stunden wirft die Frage auf, warum dieser Prozess offensichtlich langsam abläuft. Die eigentliche Rolle der Checkpoints wird generell darin gesehen, Zellen nach einer DSB-Induktion an der weiteren Progression im Zellzyklus zu hindern und einer genomischen Instabilität entgegenzuwirken. Es ist bekannt, dass nach Auftreten von DSBs zunächst eine Phosphorylierung von p53 am Serin15 durch ATM und eine anschließende Akkumulation von p53 erfolgt. Durch die Phosphorylierung konnte eine Steigerung der Aktivität des Proteins nachgewiesen werden (Kastan *et al.*, 1991). Die Phosphorylierung an Serin- und Threonin-Resten vermittelt zudem eine Stabilisierung des Proteins (Chehab *et al.*, 2000) und stimuliert dessen Acetylierung, wodurch wiederum die DNA-Bindung von p53 vergrößert wird (Szak *et al.*, 2001). Die Acetylierung scheint zudem wichtig für den p53-vermittelten G1/S-Arrest zu sein (Avantaggiati *et al.*, 1997, Gu und Roeder, 1997). Das p53-Protein wird ständig in der Zelle synthetisiert, allerdings erfolgt durch die Bindung an seinen Negativregulator Mdm2 auch ein ständiger Abbau durch Ubiquitinierung. Das Protein liegt vor der Aktivierung also in einer stets gleich bleibenden Menge im Zellkern vor. Bei Auftreten von DSBs wird p53 über ATM phosphoryliert, wodurch es von Mdm2 dissoziiert und inaktiver Form im Zellkern akkumulieren kann (Adams und Carpenter, 2006). Eine Erhöhung des p53-Levels ist, teilweise auch abhängig von der verwendeten Zelllinie und Methode bereits nach 1 h, mit einem Maximum nach 2 h und einer Abnahme nach bereits 3 h nachzuweisen (Maki und Howley, 1997). Di Leonardo *et al.* (1994) und Siliciano *et al.* (1997) wiesen erhöhte p53-Level zwischen 2 h und 3 h nach Bestrahlung nach. Loignon und Drobetsky (2002) fanden eine maximale Induktion von p53 3 h nach Bestrahlung und einen Rückgang von p53 ab 12 h nach Bestrahlung. Über die Aktivierung von p53 kann eine Verzögerung des Einsetzens des Checkpoints von mindestens 1 h bis zu 3 h erklärt werden. Da ein vollständiges Einsetzen des Checkpoints in der vorliegenden Arbeit jedoch zwischen 4 h und 6 h nach Bestrahlung beobachtet wurde, wäre es möglich, dass weitere Aktivierungsprozesse der nachfolgenden *Downstream*-Proteine der Signalkaskade bis zum Einsetzen des Checkpoints in einem Zeitrahmen von weiteren 1 h bis 5 h ablaufen.

Im Anschluss an die Aktivierung und Stabilisierung von p53 erfolgt unter anderem die Transaktivierung von p21. Die Erhöhung der Protein-Level von p21 wurden etwa 2 h bis 4 h nach Auftreten eines DNA-Schadens detektiert (Szak *et al.*, 2001) bzw. es wurde eine schrittweise Aktivierung von 3 h bis 12 h gefunden (Loignon und Drobetsky, 2002). Erhöhte Level von p21 verhindern schließlich die Aktivierung von CyclinE/Cdk2, welches den Übergang der Zellen in die S-Phase vorantreibt. Durch inaktives CyclinE/Cdk2 erfolgt keine Phosphorylierung von pRb, die notwendig ist, um Transkriptionsfaktoren zur Transkription von S-Phase-Genen zu aktivieren. So wird die weitere Zellzyklus-Proliferation verhindert (Mihara *et al.*, 1989). Es wird deutlich, dass durch die nach der Aktivierung von p53 weiter ablaufende Signalkaskade zusätzlich Zeit bis zu einer Inhibierung der Zellzyklus-Progression vergeht. Der Zeitrahmen kann hier allerdings nicht genau festgelegt werden. Das Ein-

setzen des p53-abhängigen G1/S-Checkpoints kann daher nicht dem Zeitpunkt der Hochregulation von p53 gleichgesetzt werden, sondern erfolgt um einige Stunden später.

Für das Einsetzen des G1/S-Checkpoints wurden zwei unterschiedliche Signalwege nach Auftreten von DSBs nach ionisierender Strahlung aufgezeigt, die beide letztendlich durch die Inhibierung von Cyclin-Cdk-Komplexen das Fortschreiten im Zellzyklus unterbinden. Die Phosphorylierung von Chk2 durch ATM und die folgende Inaktivierung von Cdc25A dient der schnellen Einleitung des Checkpoints. Die Aufrechterhaltung des Checkpoints wird über einen p53-abhängigen Signalweg (Kastan *et al.*, 1991) vermittelt. p53 wird hierbei ebenfalls über ATM oder Chk2 phosphoryliert, wodurch es von seinem Negativregulator Mdm2 dissoziiert und in aktiver Form im Zellkern akkumuliert (Di Leonardo *et al.*, 1994, Adams und Carpenter, 2006). p53 aktiviert p21, welches durch Bindung an den Cdk2/CyclinE-Komplex die Hyperphosphorylierung von pRb verhindert und so den G1/S-Arrest durch Inhibierung der Replikation aufrecht erhält. Man spricht von einem „Zwei-Wellen-Modell“ des G1/S-Checkpoints mit einer schnellen, innerhalb weniger Minuten einsetzenden Reaktion auf die DNA-Schäden und einer verzögerten, p53-abhängigen Komponente (Bartek und Lukas, 2001).

5.1.2 Der Restriction Point

In den ersten Stunden nach Bestrahlung wurde beobachtet, dass bestrahlte Zellen mit der gleichen Rate in die S-Phase progressieren wie unbestrahlte Zellen. Die Zellen werden trotz DSBs nicht in der G1-Phase arretiert. Um dieses Verhalten der Zellen nachvollziehen zu können, wurden zunächst biochemische Erklärungen für den Übergang der Zellen von der G1- in die S-Phase gesucht. Bei Verfolgung einer G1-Phase-Zelle durch den Zellzyklus kann festgestellt werden, dass die Menge an CyclinE/Cdk2 in der G1-Phase kurz vor dem Übergang der Zellen in die S-Phase deutlich zunimmt. Sobald die Zellen in die S-Phase gelangt sind, nimmt CyclinE ab, stattdessen tritt vermehrt CyclinA auf (Koff *et al.*, 1992). Die Cdks bleiben während des Verlaufs des Zellzyklus im Vergleich zu den Cyclinen relativ stabil. Die Cycline hingegen werden schnell beim Übergang in die nächste Zellzyklus-Phase nach Export aus dem Zellkern in das Zytoplasma ubiquitiniert und über das Proteasom abgebaut. Zeitgleich findet ein Anstieg des Expressionsniveaus des nächsten Cyclins statt (Peters, 1999). Ein weiteres Protein, das für die Progression der Zellen in die S-Phase von Bedeutung ist, ist pRb. Während der G1-Phase liegt pRb hypophosphoryliert vor. Die initiale Phosphorylierung erfolgt während der frühen G1-Phase. Kurz vor dem Übertritt der Zelle in die S-Phase wird pRb durch CyclinE/Cdk2 hyperphosphoryliert, die Hyperphosphorylierung bleibt durch die gesamte S- und G2-Phase erhalten (De Caprio *et al.*, 1992). Der Anteil von hypophosphoryliertem zu hyperphosphoryliertem pRb erhöht sich 3 h nach Bestrahlung (Loignon und Drobetsky, 2002). Somit erscheint es möglich, dass Zellen, die gegen Ende der G1-Phase bestrahlt werden und zu diesem Zeitpunkt noch kein erhöhtes Level an p53 und p21 aufweisen, aber eine erhöhte Menge CyclinE/Cdk2 am Ende der G1-Phase und somit phosphoryliertes pRb, trotz einer erheblichen Anzahl von DSBs über einen Zeitraum von 4 h in die S-Phase progressieren können. Dieses Verhalten bestrahlter Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden. Diese späten G1-Zellen

müssen sich in einem Bereich von etwa 2 h vor Beginn der Replikation befinden. Dieser Punkt wird als *Restriction Point* bezeichnet (Sancar *et al.*, 2004).

Es wird angenommen, dass der *Restriction Point* einen Punkt im Zellzyklus darstellt, nach welchem die Zellen in der G1-Phase nicht mehr arretiert werden können und auch mit Schäden in die nächste Zellzyklus-Phase eintreten. Gadbois und Lehnert (1997) vermuten eine Regulierung des *Restriction Points* über CyclinE, was bedeuten würde, dass Zellen nicht mehr am Eintritt in die S-Phase gehindert werden können, sobald Ende der G1-Phase vermehrt CyclinE vorliegt. Auch diese Annahme würde sich mit den vorliegenden Daten decken. Die Beobachtung eines fehlenden schnellen G1-Arrests findet sich auch bei Cann und Hicks (2006), die nach Bestrahlung von p53-profizienten MEF-Zellen mit 5 Gy eine Progression des Großteils der bestrahlten G1-Zellen in die S-Phase beschreiben. In diesem Versuchsansatz wurden die Zellen in der späten G1-Phase bestrahlt, wodurch sie möglicherweise hinter dem sogenannten *Restriction Point* lagen. Die Autoren stellten daraufhin ein neues Modell für die Vorgänge am Übergang von der späten G1- in die S-Phase von spät in der G1-Phase bestrahlten Zellen auf. Sie postulieren, dass am *Restriction Point* ein Umschalten zwischen globaler und origin-spezifischer Regulation, wie sie in der S-Phase vorkommt, stattfindet. Beim Voranschreiten im Zellzyklus ist die Zelle vom Vorhandensein von Wachstumsfaktoren (Mitogenen) abhängig. Fehlen diese Signale, erfolgt ein Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase. Allerdings werden Wachstumsfaktoren während der G1-Phase nur bis etwa 2-3 h vor Eintritt in die S-Phase benötigt (Pardee, 1974). Ab diesem Zeitpunkt, dem *Restriction Point*, exprimiert die Zelle Proteine, die den Eintritt in die S-Phase vorbereiten und progressiert ohne die Stimulation mitogener Signale weiter in die S-Phase. Es ist bekannt, dass sich sogenannte *prereplicative complexes* (pre-RC) bilden, welche vor allem in *Saccaromyces cerevisiae*, *Xenopus laevis* und auch im Menschen untersucht wurden (Da Silva und Duncker, 2007). Der *Origin Recognition Complex* (ORC) dient hierbei als Gerüst für den Aufbau des pre-RC in der G1-Phase. Einige Modelle gehen nun davon aus, dass diese Origins, einmal für die DNA-Replikation bereitgestellt, nicht mehr abgebaut werden können und die Replikation im Anschluss an die Bereitstellung in jedem Fall durchgeführt wird. Somit ist es möglich, dass in Zellen, die in der späten G1-Phase bestrahlt wurden, schon pre-RC-Komplexe existieren und die Zellen nach Auftreten von Schäden nicht in der G1-Phase arretiert werden, sondern mit dem weiteren Aufbau der Origins und schließlich mit der Replikation beginnen. Bis heute ist nicht geklärt, ob der Aufbau der Origins durch Proteine der Checkpoint-Signalkaskade unterbunden werden kann.

5.1.3 Das Aufheben des G1/S-Checkpoints

Neben der Aktivierung des Checkpoints wurde mit den Methoden der Durchflusszytometrie und des PCNA-Ansatzes auch das Aufheben des G1/S-Checkpoints untersucht. Ab 8 h nach Bestrahlung mit niedrigen Dosen und bis zu 10-12 h nach Bestrahlung mit höheren Dosen konnte die erneute Progression von G1-Phase-Zellen in die S-Phase beobachtet werden. Je höher die Dosis war, mit der bestrahlt wurde, desto später traten G1-Phase-Zellen erneut in die S-Phase ein. Dieses Verhalten spricht für eine dosisabhängige Dauer des G1-Arrests. Dies deutet darauf hin, dass DSBs auf ein bestimmtes Level repariert werden, bevor die Zellen aus dem Checkpoint entlassen werden und

weiter durch den Zellzyklus proliferieren. Dies geschieht umso später, je mehr DSBs die Zellen durch eine höhere Bestrahlungsdosis reparieren müssen. Eine weitere Möglichkeit ist das Aufheben des Checkpoints nach Ablauf einer bestimmten Zeit. Einzelne Zellen zeigen somit einen Checkpoint-*Escape* und mit hohen Dosen bestrahlte Zellen würden dann immer noch unreparierte DSBs in der G2-Phase aufweisen.

Auch in den Studien aus dem Labor von P. A. Jeggo, die parallel zu diesen Arbeiten durchgeführt wurden, wurden Zellen 8,5 h nach Stimulation, also 1,5 h vor Eintritt der Zellen in die S-Phase bestrahlt. Zu frühen Zeiten wurde eine dosisabhängige Verlangsamung beim S-Phase-Eintritt mit anschließendem Checkpoint-Arrest 10 h nach Bestrahlung gemessen. Bei niedrigen Dosen konnte nach längeren Zeiten die Aufhebung des Checkpoints beobachtet werden. Die Analyse von Artemis-defizienten Zellen mit einem Reparatur-Defekt in der langsamen Reparatur-Komponente der DSB-Reparatur zeigte nach Bestrahlung kein Aufheben des Checkpoints bei hohen Dosen zu späten Zeiten. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass das Aufheben von der Höhe des DSB-Levels abhängig ist.

Linke *et al.* (1997) beschreiben neben einer Population, die sofort nach Bestrahlung in die S-Phase eintrat, eine zweite Population von bestrahlten Zellen, welche die S-Phase deutlich später als die Kontrolle erreicht. Diese zweite Welle des Eintretens bestrahlter Zellen in die S-Phase stellten wahrscheinlich Zellen dar, die den Checkpoint aktiviert und zu einer späteren Zeit wieder aufgehoben hatten. Lange *et al.* (2004) wiesen ein Aufheben des Checkpoints etwa 30 h nach Bestrahlung von G1-Phase-Zellen mit 2 Gy, 4 Gy und 8 Gy nach und somit wesentlich später, als das Aufheben des Checkpoints in der vorliegenden Arbeit gemessen wurde. Von einer unterschiedlichen Dauer des Arrests nach Verwendung verschiedener Bestrahlungsdosen wurde nicht berichtet. Hierbei wurden allerdings Amnionzellen verwendet, welche eine langsamere Proliferationsrate als primäre Zellen aufweisen. Ein Aufheben des Checkpoints 15 h nach γ -Bestrahlung mit 2 Gy in humanen Fibroblasten und damit nahezu konsistent mit den hier dargestellten Daten, konnten Gadbois und Lehnert (1997) nachweisen.

Nach Linke *et al.* (1997) ist noch eine dritte Population von Zellen nach Bestrahlung erkennbar. Dabei handelt es sich um diejenigen Zellen, die dauerhaft am G1/S-Checkpoint festgehalten werden (Nagasawa und Little, 1983). Bei Betrachtung der *DotPlots* der durchflusszytometrischen Analyse dieser Arbeit ist über den gesamten Versuchszeitraum eine BrdU-negative Population in der G1-Phase erkennbar, die nicht deutlich abzunehmen scheint. Entweder werden diese Zellen verlängert oder permanent am G1/S-Checkpoint aufgrund ihrer (noch) unreparierten DNA-Schäden festgehalten, oder diese Zellen befinden sich in der G0-Phase des Zellzyklus und proliferieren nicht. Dies ist ebenso konsistent mit Daten der Gruppe um P. A. Jeggo, in denen bestätigt werden konnte, dass die Fraktion der proliferierenden Zellen mit steigender Dosis abnimmt (Deckbar *et al.*, 2010).

Doch sowohl Leonardo *et al.* (1994) als auch Linke *et al.* (1997) vermuteten, dass der p53-abhängige G1/S-Checkpoint Zellen mit DSBs eher aus der aktiv proliferierenden Population entfernt, als einen transienten Arrest zur besseren Reparatur der Schäden zu vermitteln. Dagegen zeigen die vorliegenden Daten, dass auch der p53-abhängige Checkpoint nach einer bestimmten Zeit wieder aufge-

hoben werden kann. Dies ist selbst der Fall, wenn DSBs noch nicht vollständig repariert wurden und einzelne Zellen mit Schäden weiter durch den Zellzyklus progressieren.

5.1.4 Sensitivität des G1/S-Checkpoints

Bei der Untersuchung der zeitlichen Regulation des Einsetzens des G1/S-Checkpoints wurde deutlich, dass Zellen in den ersten Stunden nach Bestrahlung ungehindert in die S-Phase progressierten. Reparaturmessungen an fixierten Zellen in der G1-Phase und der frühen S-Phase ergaben, dass viele Zellen den Checkpoint mit einer erheblichen Anzahl an unreparierten DSBs überwandern. Um die Sensitivität des G1/S-Checkpoints in Bezug auf die Anzahl der DSBs genauer zu bestimmen, wurden DNA-Schäden in Zellen der G1- und der frühen S-Phase untersucht. Neben klassischen Methoden wie Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurde hier schwerpunktmäßig die Methode des *Live Cell Imaging* (LCI) verwendet.

Die Methode des LCI eröffnet neue Möglichkeiten im Vergleich zu herkömmlicher Mikroskopie mit fixierten Zellen. Die Verfolgung einzelner Zellen in sehr kurzen Intervallen über lange Zeiträume gibt Aufschluss über das zelluläre Verhalten oder die Funktion und Regulation zellulärer Vorgänge. Die Fusion von fluoreszierenden Proteinen mit Reparaturproteinen ermöglicht die Messung der DSB-Reparatur in lebenden Zellen. Durch die gleichzeitige Transfektion mit Zellzyklus-Markern wird die Reparatur der DSBs durch den gesamten Zellzyklus ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit wurden Plasmide für GFP-53BP1 (Lukas *et al.*, 2004) als Marker für DSBs und für RFP-Ligasel als Marker für den Eintritt der Zellen von der G1-Phase in die S-Phase verwendet (Easwaran *et al.*, 2005). In Kontrollversuchen zeigte sich eine Kolo-kalisation von fixierten GFP-53BP1- und γ -H2AX-Foci, was bestätigt, dass das exprimierte GFP-53BP1 die tatsächlichen DSBs in einer lebenden Zelle wiedergibt (Abb. 20). Mit der Methode des LCI konnte nun ohne Verzögerung durch den Einbau von Substraten wie BrdU und EdU oder der Färbung von Proteinen die zeitliche Regulation des G1/S-Checkpoints und seine Sensitivität untersucht werden. Anhand einzelner Zellen wurde untersucht, wann der Checkpoint einsetzt und mit wie vielen DSBs eine Zelle in die S-Phase eintritt.

Für die LCI-Experimente wurden zunächst U2OS-Zellen verwendet. Ausschlaggebend waren die gute Transfizierbarkeit im Vergleich zu Fibroblasten und die gute Proliferationsfähigkeit der Tumorzellen. Allerdings zeigten U2OS-Zellen ein eher schwaches Einsetzen des G1/S-Checkpoints im Vergleich zu den bisher erhaltenen Ergebnissen. Dies könnte daran liegen, dass U2OS trotz vorhandenem p53 Mutationen in anderen Genen, welche für die Zellzyklus-Regulation wichtig sind, besitzen. Um diese Fehlerquelle auszuschließen wurden 82-6hTert-Zellen verwendet.

Vor Aufnahme im LCI-System wurden 82-6hTert-Zellen mit den Konstrukten GFP-53BP1 und RFP-Ligasel transient transfiziert. Da die verwendeten Fibroblasten nur schwer über chemische Methoden zu transfizieren waren, wurde die Methode der Elektroporation (Nucleofector, Lonza) verwendet. Anschließend wurde über den Mitotischen Index die Proliferationsfähigkeit der transfizierten Zellen mit denen untransfizierter Zellen verglichen (Abb. 19) und festgestellt, dass keine Unterschiede bei der Progression durch den Zellzyklus auftraten. Ebenso wurde beim Reparaturverhalten

von DSBs transfizierter Zellen im Vergleich zu untransfizierten keine großen Abweichungen gefunden (Abb. 21). Bei der Aufnahme einer Reparaturkurve von GFP-53BP1 im LCI-System nach Bestrahlung und Auswertung über eine Software am Bildschirm konnte allerdings ein entscheidender Unterschied zur herkömmlichen Auswertung über Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit fixierten, gefärbten Zellen festgestellt werden. Bei der Auszählung der GFP-53BP1-Foci am Bildschirm wurde zu allen Reparaturzeitpunkten nur die Hälfte der Foci im Vergleich zu fixierten γ -H2AX- und 53BP1-Foci im Mikroskop gezählt (Abb. 22 und Abb. 23). Der Grund für diesen beträchtlichen Unterschied lag in der schlechten Auflösung des Bildschirms im Vergleich zum Mikroskop. Außerdem wurden zur Schonung der Zellen nur 3 Ebenen aufgenommen, die in einem Bild projiziert wurden. Diese Aufnahmetechnik konnte das Durchfokussieren durch den Zellkern am Mikroskop nicht ersetzen. Somit lagen die Werte aller Foci, fixierten γ -H2AX, 53BP1 oder GFP-53BP1, welche über das LCI-System unter vergleichbaren Bedingungen zu den LCI-Experimenten aufgenommen und am Bildschirm ausgewertet wurden, um die Hälfte niedriger als die Werte der entsprechenden Proben, die am Mikroskop ausgewertet wurden. Die Halbierung der Fociwerte bei der Auszählung am Bildschirm müssen bei der Interpretation der LCI-Versuche berücksichtigt werden.

Nach Transfektion der Plasmide, Aussaat der transfizierten Zellen in speziellen, für die Verwendung im LCI geeigneten Zellkulturgefäßen und 48-stündiger Inkubation im Brutschrank, wurden die Zellen bestrahlt und stündlich von jeder zuvor definierten Position des Zellkulturgefäßes ein Bild in Durchlicht und Auflicht (GFP- und TxR-Filter) im LCI-System aufgenommen. Durch die gleichzeitige Transfektion von RFP-Ligasel und GFP-53BP1 konnten zu jedem Zeitpunkt in jeder Zellzyklus-Phase die DSBs nach Bestrahlung quantifiziert werden. Da sich die Anzahl der Foci in den Zellen z.T. stark unterschied, wurden die Zellen gemäß dem Zeitpunkt des Eintretens in die S-Phase geordnet und in einem Abstand von 3 h gruppiert (Abb. 26). Die Induktion der mit 1 Gy bestrahlten Zellen lag bei allen Gruppen zwischen 10 und 16 GFP-53BP1-Foci. Zellen, die bis zu 6 h nach Bestrahlung in die S-Phase eintraten, zeigten zwischen 5 und 8 GFP-53BP1-Foci zum Zeitpunkt des Eintritts in die S-Phase. Zellen, die später als 6 h nach Bestrahlung in der G1-Phase in die S-Phase progressierten, zeigten geringere GFP-53BP1-Foci-Werte zwischen 2 und 4. Dies ist auf die längere Reparaturzeit in der G1-Phase zurückzuführen. In den ersten 6 h nach Bestrahlung treten viele Zellen durch das fehlende Einsetzen eines G1/S-Checkpoints mit 5 bis 8 GFP-53BP1-Foci in die S-Phase ein. Da bei der Auswertung am Bildschirm nur etwa jeder zweite DSB als GFP-53BP1-Focus erkannt wurde, treten die Zellen dadurch mit etwa 10 bis 16 DSBs in die S-Phase ein.

Die klassische Methode zur Bestimmung des Schadenslevels von G1-Phase-Zellen bei der Progression in die S-Phase basierte auf der im vorigen Kapitel beschriebenen EdU/BrdU-Markierung, erweitert um den Schritt einer γ -H2AX-Färbung zur Detektion der DSBs. Eine exponentiell wachsende Population von 82-6hTert-Zellen wurde zunächst mit EdU markiert, welches bis 2 h vor Fixierung im Medium blieb, um Zellen auszuschließen, die sich länger als 2 h in der S-Phase befunden hatten. 2 h vor Fixierung wurde EdU durch BrdU ersetzt. So war es möglich, zu allen Zeitpunkten die vorhandenen Schäden in Zellen der frühen S-Phase in EdU-negativen und BrdU-positiven Zellen auszuwerten. Es zeigte sich, dass die Anzahl der γ -H2AX-Foci in G1-Phase-Zellen und Zellen der frühen S-Phase zu den entsprechenden Reparaturzeitpunkten ähnlich hoch waren. Dies zeigt, dass der Checkpoint in

den ersten Stunden unempfindlich gegenüber Zellen mit einer hohen Anzahl an DSBs ist. Die Zellen progressieren trotz DSBs in die S-Phase, bevor auf ein geringes Schadens-Level repariert werden konnte. Die Anzahl der EdU-negativen und BrdU-positiven Fraktion verringerte sich deutlich ab 6 h nach Bestrahlung, vor allem in höher bestrahlten Populationen. Aber auch Zellen, die nur mit 0,2 Gy bestrahlt worden waren, zeigten einen verminderten S-Phase-Eintritt. Bei dieser Population konnte man davon ausgehen, dass über einen Zeitraum von 6 h die meisten DSBs repariert worden waren. Trotz allem wurden noch Zellen, vermutlich mit einer sehr geringen Anzahl an DSBs vom p53-abhängigen Checkpoint in der G1-Phase arretiert. Dies wurde ebenfalls im Labor von P. A. Jeggo nachgewiesen, die synchronisierte Zellen 30 min nach Stimulation bestrahlten und eine Verzögerung des S-Phase-Eintritts nach einem G1-Arrest selbst nach 100 mGy feststellten. Artemis-defiziente Zellen zeigten bei gleicher Behandlung einen verlängerten Arrest. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zur Aufhebung des Checkpoints die Reparatur der DSBs notwendig ist. Dies lässt darauf schließen, dass der G1/S-Checkpoint nach dem vollständigen Einsetzen sehr sensitiv auf DSBs reagiert. Dies steht im Einklang mit Experimenten von Di Leonardo *et al.* (1994), Huang *et al.* (1996) und Linke *et al.* (1997). In verschiedenen Ansätzen wurde *in vitro* DNA in Form von Plasmiden mit einem oder mehreren Brüchen bzw. linearisierte DNA direkt in Zellen injiziert und festgestellt, dass ein p53-abhängiger Arrest der jeweiligen Zellen in der G1-Phase induziert wurde. Somit ergab sich die Vorstellung eines G1/S-Checkpoints als „Master-Checkpoint“, der Zellen an ihrer weiteren Progression durch den Zellzyklus hindert, sobald sie einen oder wenige DSBs aufweisen. In Bezug auf die Aufrechterhaltung des Checkpoints gehen Yamauchi *et al.* (2008) einen Schritt weiter. Sie bestimmen die Sensitivität des Checkpoints nicht nur in Bezug auf die Anzahl der DSBs, sondern vor allem auf die Größe der einzelnen Foci. Die Autoren gehen davon aus, dass nicht die initialen Foci darüber entscheiden, ob eine Zelle am Checkpoint arretiert wird, sondern wenige, persistierende phosphorylierte ATM-Foci (meist im Zusammenspiel mit anderen Reparaturfaktoren wie γ -H2AX, MDC1 und 53BP1). Durch den langsam einsetzenden G1/S-Checkpoint wurden die meisten initialen DSBs repariert, bevor der Checkpoint aktiviert wird. Es wird davon ausgegangen, dass ein Wachstum der noch vorhandenen persistierenden Foci einen Mechanismus darstellt, um das G1-Checkpoint *Signaling* in Zellen mit einer geringen Focianzahl zu verstärken. So wurde eine signifikante Korrelation zwischen dem Durchmesser eines einzelnen persistierenden ATM-Focus und der Fluoreszenz-Intensität von phosphoryliertem p53 von dieser Arbeitsgruppe nachgewiesen. Die Bedeutung dieser persistierenden und wachsenden Foci liegt dabei nach Meinung der Autoren im dauerhaften Ausschluss von Zellen mit DSBs aus der aktiv proliferierenden Population und unterstreicht weiterhin die hohe Sensitivität des G1/S-Checkpoints. Möglicherweise sind sowohl die initialen Foci für die Aktivierung des G1/S-Checkpoints, als auch die wachsenden, persistierenden Foci ein Signal für die Aufrechterhaltung des Checkpoints.

Das Wachstum einzelner GFP-53BP1-Foci wurde auch während *Live Cell Imaging*-Anwendungen beobachtet. Nachdem in G1-Phase-Zellen fast alle durch Bestrahlung induzierten Foci repariert waren, konnte in einzelnen Zellen ein bis zwei größer werdende Foci detektiert werden, die über lange Zeit persistierten. Diese Zellen gelangten während der meist 24 h dauernden Aufnahmen nicht in die S-Phase. Dieses Modell könnte das im vorigen Kapitel aufgestellte Modell einer frühen, un-

empfindlichen und einer späten, sensitiven Checkpoint-Antwort ergänzen. Zellen, die in der späten G1-Phase hinter dem *Restriction Point* bestrahlt wurden, werden trotz einer hohen Anzahl von DSBs nicht vollständig vom schnell einsetzenden p53-unabhängigen Checkpoint festgehalten. Es gelingt nur eine leichte, dosisabhängige Verlangsamung des S-Phase-Eintritts. Ein Teil der Zellen mit DSBs werden am Checkpoint arretiert, solange DSBs vorhanden sind. Der Checkpoint wird nach Reparatur der Foci wieder aufgehoben. Einige Zellen besitzen wenige, jedoch irreparable Schäden. Das Checkpoint-Signaling wird durch das Anwachsen der Foci verstärkt und die Zellen befinden sich in einem permanenten Arrest.

Beim Vergleich von G1/S-Checkpoint und G2/M-Checkpoint sind die Signalkaskaden für das Checkpoint-Signaling sehr ähnlich. Auf zellulärer Ebene erkennt man allerdings deutliche Unterschiede. Das Einsetzen des G1/S-Checkpoints erfolgt langsam innerhalb von 4 h bis 6 h. Das Einsetzen des G2/M-Checkpoints hingegen erfolgt innerhalb 1 h. Der G1/S-Checkpoint ist nach vollständigem Einsetzen sensitiv und arretiert Zellen mit nur wenigen DSBs. Der G2/M-Checkpoint ist eher insensitiv und entlässt Zellen mit 10 bis 20 DSBs in die Mitose.

Die Limitierungen sowohl des G1/S- als auch des G2/M-Checkpoints können zur Entstehung von Chromosomenaberrationen und somit zur Entartung der Zellen führen. Aber es wird vermutet, dass Zellen, welche direkt nach Bestrahlung weder am G1/S- noch am G2/M-Checkpoint aufgehalten wurden, in der folgenden Zellzyklus-Phase arretiert werden, um noch bestehende DSBs zu reparieren. Die nächste Möglichkeit zum Arrest ist wiederum der G1/S-Checkpoint. Linke *et al.* (1997) konnten zeigen, dass Zellen, welche nach Bestrahlung in die erste S-Phase progressierten in der folgenden G1-Phase arretiert wurden. Zudem gibt es hierzu Hinweise unserer Arbeitsgruppe (Lucie Iloff, persönliche Mitteilung). Für Zellen, die in der G2-Phase des Zellzyklus bestrahlt wurden, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass diese in der folgenden G1-Phase arretiert werden (Pellegata *et al.*, 1996, Deckbar *et al.*, 2010). Trotz der Limitierungen des G1/S-Checkpoints würden diese Beobachtungen in das Bild des „Master-Checkpoints“ passen – allerdings erst für den zweiten oder dritten Zellzyklus nach Bestrahlung.

5.1.5 Verfolgung von GFP-53BP1-Foci durch die S-Phase

Das langsame Einsetzen des G1/S-Checkpoints führt dazu, dass Zellen mit einer erheblichen Anzahl unreparierter DSBs in die S-Phase progressieren. Dies geschieht so lange, bis der p53-abhängige Checkpoint vollständig aktiviert ist und die G1-Phase-Zellen am G1/S-Checkpoint beim Eintritt in die S-Phase gehindert werden. Aber auch zu längeren Zeiten überwinden einzelne Zellen den G1-Arrest und treten mit einer erhöhten Anzahl an DSBs in die S-Phase ein. Es stellte sich daher die Frage, was mit diesen unreparierten DSBs bei der Progression durch die S-Phase geschieht. Die Methode des LCI bietet die Möglichkeit, nicht nur einzelne Zellen, sondern auch einzelne DSBs über einen langen Zeitraum lückenlos zu verfolgen. So sollte durch die Verfolgung einzelner Zellen durch die S-Phase und die Quantifizierung der vorhandenen GFP-53BP1-Foci geklärt werden, ob die aus der G1-Phase stammenden GFP-53BP1-Foci während der S-Phase repariert werden und ob durch die vorhandenen Schäden die Entstehung neuer Brüche begünstigt wird.

Bei der Quantifizierung der GFP-53BP1-Foci wurden teilweise große Schwankungen in der Focianzahl zwischen den einzelnen Zellen festgestellt. Die allgemeine Tendenz zeigte jedoch, dass die DSBs während der S-Phase anstiegen. Um Unterschiede zwischen früh nach Bestrahlung und spät nach Bestrahlung in die S-Phase eintretenden Zellen zu untersuchen, wurde die Gruppierung der Zellen bei Auswertung der G1-Phase auch bei Auswertung der S-Phase beibehalten. In Zellen, welche früh nach Bestrahlung mit einer hohen Anzahl GFP-53BP1-Foci in die S-Phase progressierten, fand in den ersten Stunden der S-Phase eine Reparatur auf etwa die Hälfte der DSBs statt. In den anderen Gruppen, welche weniger als die Hälfte GFP-53BP1-Foci der ersten Gruppe zu Beginn der S-Phase aufwiesen, stagnierte die Anzahl der Foci. 3 h bis 4 h nach Eintritt in die S-Phase erfolgte in allen Gruppen bis zum Ende der S-Phase ein kontinuierlicher Anstieg der GFP-53BP1-Foci. Dieser Anstieg wurde nicht nur in bestrahlten Zellen, sondern auch in unbestrahlten Kontrollzellen beobachtet. Deshalb wurde zunächst überprüft, ob diese in der S-Phase neu entstandenen Foci das Ergebnis zu intensiver Belichtung in der S-Phase während der Aufnahme der Zellen im LCI-System darstellten. Während der Replikation können die durch intensive Belichtung entstehenden ESBs zum Kollabieren von Replikationsgabeln und zur Entstehung von DSBs führen. In einem Kontrollexperiment wurde eine Probe transfizierter Zellen regelmäßig in kurzen Zeitabständen, eine zweite Probe in wesentlich größeren Zeitabständen im LCI-System unter standardisierten Aufnahmebedingungen während der S-Phase belichtet. Bei Auszählung der Foci Ende der S-Phase hatten sich durch das häufigere Belichten keine zusätzlichen GFP-53BP1-Foci entwickelt. Das Ansteigen der Focizahlen ist somit nicht auf die Belichtung zurückzuführen, sondern auf das Vorhandensein spontan entstandener ESBs bzw. strahleninduzierter ESBs und Basenschäden zurückzuführen.

Nach Vilenchik und Knudson (2003) erfolgt die Bildung endogener oder replikationsassoziiierter DSBs während der S-Phase in zwei Schritten. Bei Bestrahlung der Zellen während eines normalen Zellzyklus entstehen neben DSBs auch eine große Zahl einzelsträngiger Läsionen (SSL), die dann in einem zweiten Schritt während der S-Phase zu DSBs umgesetzt werden. Spontan entstehen etwa 1000 einzelsträngige Läsionen pro Stunde, davon 600 ESBs und apurine/apyrimidine Stellen, 100 Thymin-Glykole und 200 8-Oxoguanine. Pro S-Phase entstehen bis 5000 einzelsträngige Läsionen, in der Mehrzahl werden diese über fehlerfreie Mechanismen repariert, 1 % bleibt unrepariert. Diese unreparierten SSL führen schließlich zum Anhalten oder Kollabieren von Replikationsgabeln, aus einigen der Läsionen gehen DSBs hervor. Aus 5000 SSL entwickeln sich so 50 DSBs pro S-Phase (Jeggo, 1998, Vilenchik und Knudson, 2000). In Bakterien konnte gezeigt werden, dass ein ESB für den Kollaps einer Replikationsgabel verantwortlich ist und zu einem DSB führt (Kuzminov, 2001).

Die größte Zunahme der replikationsassoziierten Foci erfolgte in jener Gruppe, welche auch die meisten Foci zu Beginn der Phase aufwies (Abb. 28 und Abb. 29). Da diese Gruppe direkt vor Eintritt in die S-Phase bestrahlt worden war, könnten die Zellen einen noch deutlich höheren Anteil einzelsträngiger Brüche und Basenschäden im Vergleich zu Zellen zeigen, die länger vor Eintritt in die S-Phase bestrahlt wurden. Für die Reparaturkinetik von Basenschäden in Säugerzellen wird eine exponentielle Abnahme mit einer Halbwertszeit von 20-40 min beschrieben. Die Reparatur der Basenschäden ist nach 10-12 h weitestgehend abgeschlossen, wobei etwa 3-8 % der Schäden unrepariert verbleiben. Die Reparaturkinetik von ESBs ist dreiphasig. Für die erste, schnelle Phase

gilt eine Halbwertszeit von 2-4 min, für die zweite eine von 20-30 min, für die dritte eine Halbwertszeit von 150-250 min. Die erste Phase beschreibt die Reparatur primärer ESBs, die unmittelbar nach Bestrahlung entstehen, die zweite Phase beschreibt die Reparatur sekundärer ESBs. Diese entstehen bei der Reparatur von Basenschäden. Die Anzahl der sekundären ESBs nimmt nach Bestrahlung schnell zu, dieser Anstieg wird aber durch die sofortige Abnahme der primären ESBs überdeckt. Die Schäden der dritten Phase sind nur zum Teil bekannt, möglicherweise sind ein Teil der Schäden DSBs, die langsam repariert werden. Die Reparatur der ESBs ist innerhalb von 10-12 h abgeschlossen, wobei 99 % der Brüche repariert werden (Dikomey und Franzke, 1986, Fohe und Dikomey, 1994). Die kurz (0 h bis 3 h) vor Eintritt in die S-Phase bestrahlten Zellen besitzen somit bei Betrachtung der Reparaturkinetiken sowohl ESBs als auch Basenschäden. Sie entwickeln während der S-Phase somit auch eine größere Anzahl von replikationsassoziierten DSBs als Zellen, die nach Bestrahlung länger in der G1-Phase verblieben und sowohl die Reparatur von ESBs als auch Basenschäden vorantreiben konnten.

Während der S-Phase konnte durch die Verfolgung der DSBs im Allgemeinen eine große Dynamik bei der Entstehung und der Reparatur beobachtet werden. Bei Beobachtung einzelner Foci konnte auch kein klarer Zeitrahmen zwischen Entstehung und Reparatur der Foci bestimmt werden. Einige Foci wurden schon 2 h nach ihrem Auftauchen repariert, andere überdauerten 8 h bis 10 h. Insgesamt kamen große Schwankungen der Anzahl der Foci im zeitlichen Verlauf zustande.

Bei genauer Betrachtung der zu Beginn der S-Phase vorhandenen und während der S-Phase entstehenden GFP-53BP1-Foci (Abb. 30) waren die schon bestehenden, durch Bestrahlung induzierten GFP-53BP1-Foci ausgeprägter und heller als die replikationsassoziierten Foci der S-Phase. Die strahleninduzierten Foci wurden im Verlauf der S-Phase meist vollständig repariert, in einigen Fällen überdauerte ein einzelner Focus die S-Phase bis zur G2-Phase. Während der Progression strahleninduzierter DSBs durch die S-Phase entwickelten sich teilweise einzelne, größer und länglicher werdende GFP-53BP1-Foci. Um zu verifizieren, dass strahleninduzierte DSBs während der S-Phase repariert wurden, erfolgte die Zugabe eines DNA-PK-Inhibitors (DNA-PKi). Mittels des Inhibitors wurde die Reparatur der strahlenassoziierten DSBs verhindert, wodurch sie über den gesamten Zeitraum der S-Phase sichtbar blieben. Der Anstieg der Foci fand ebenso wie bei unbehandelten Zellen statt. Zugleich war das Focilevel in der S-Phase höher als in unbehandelten Zellen. An den Orten der reparierten Foci zeigten sich im Verlauf der S-Phase keine neu entstehenden Foci, wodurch bestätigt wurde, dass es sich beim „Verschwinden“ von GFP-53BP1 tatsächlich um Reparatur und nicht um eine Verlagerung der Foci im Zuge von Chromatin-Umstrukturierungen handelte. Bei den neu entstandenen Foci handelte es sich somit um replikationsassoziierte DSBs, welche durch Basenschäden oder noch vorhandene ESBs während der Replikation entstanden waren.

In der S-Phase wurde eine nahezu vollständige Reparatur der strahleninduzierten GFP-53BP1-Foci beobachtet. Die Bestrahlung der Zellen während der G0/G1-Phase resultiert in Chromosomenbrüchen in der Metaphase (Cornforth und Bedford, 1993). In diesem Fall wurde der durch Bestrahlung induzierte DSB repliziert, und es befindet sich ein DSB auf beiden Schwesterchromatiden des Chromosoms an derselben Stelle. Bei der Induktion von DSBs in bereits replizierten Bereichen entstehen Chromatidbrüche, bei denen nur eine Stelle des Chromosoms betroffen ist, dieselbe Stelle auf dem

Schwesterchromatid ist noch intakt (Cornforth und Bedford, 1993). Bei Deckbar *et al.* (2010) wurde nach Bestrahlung der Zellen in der G1-Phase die Entstehung von Chromosomenbrüchen in der folgenden Mitose überprüft. Die Zellen wurden vor Bestrahlung mit EdU markiert, um bestrahlte S- und G2-Phase-Zellen bei der Auswertung der Chromosomen auszuschließen. Bei Auswertung der Chromosomenspreitungen in der folgenden Mitose konnte eine erhöhte Anzahl von Chromosomenbrüchen festgestellt werden. Dies ist ein weiterer Nachweis dafür, dass in der G1-Phase induzierte DSBs demnach durch die S-Phase bis zur G2-Phase erhalten bleiben. Ebenso entstanden Chromosomenbrüche in der folgenden G2-Phase, wenn nach Induktion des Checkpoints die Zellen mit DSBs vorzeitig aus dem Arrest entlassen wurden. Nach den vorliegenden Daten der LCI-Mikroskopie hätte man erwartet, dass nur sehr wenige Chromosomenbrüche aufgrund weniger persistierender Foci in der G2-Phase nachzuweisen sind. Allerdings lag die Anzahl der Chromosomenbrüche höher als aufgrund der Focidaten erwartet. Möglicherweise verblieben in den Zellen unreparierte ESBs in enger räumlicher Nähe, wodurch während der Replikation in der S-Phase zusätzliche DSBs und in der Folge eine höhere Anzahl an Chromatidbrüchen entstanden, als erwartet wurden. In dieser begleitenden Studie konnten neben Chromosomen- auch Chromatidbrüche in der G2-Phase und Mitose detektiert werden. Dies wurde in erster Linie für in der S- und in der G2-Phase bestrahlte Zellen beschrieben (Cornforth und Bedford, 1993). Allerdings können bei Bestrahlung früher S-Phase-Zellen ebenfalls Chromatid- und Chromosomenbrüche in der G2-Phase nachgewiesen werden. Da aber in der begleitenden Studie die Experimentbedingungen so gewählt waren, dass Zellen ausgewertet wurden, deren Bestrahlung kurz vor Eintritt in die S-Phase stattfand, kann davon ausgegangen werden, dass ESBs noch nicht vollständig repariert wurden und dies zu Chromatidbrüchen führte.

In der Summe ist während der S-Phase keine Abnahme des Focilevels zu erkennen, erst gegen Ende der S-Phase kann eine leichte Verringerung des Focilevels festgestellt werden (Abb. 31). Der Grund für das Ansteigen des Levels replikationsassoziiierter, neu entstandener DSBs könnte darin liegen, dass bei der Reparatur replikationsinduzierter Brüche die schnelle Reparatur durch NHEJ nicht involviert ist, sondern diese Brüche durch die langsamere HR repariert werden (Rothkamm *et al.*, 2003, Nikolova *et al.*, 2010).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es Zellen durch das langsame Einsetzen des G1/S-Checkpoints gelingt, mit einer erhöhten Anzahl von DSBs in die S-Phase zu progressieren. Während der Reparatur der in der G1-Phase durch IR induzierten DSBs im Verlauf der S-Phase entstehen neue, replikationsabhängige Foci. Diese Vorgänge führen schließlich neben einer erhöhten Anzahl von DSBs in der G2-Phase zu Chromosomen- und Chromatidbrüchen mit Auswirkungen auf die genomische Stabilität der Zelle.

5.2 Die Checkpoint-Regulation nach UVC-Bestrahlung

Werden biologische Moleküle mit (UV)-Licht bestrahlt, können genotoxische Effekte auftreten (Photochemische Genotoxizität). Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt im Bereich von

254 nm (UVC). Genotoxische Effekte erreichen ein Maximum bei 260 nm und nehmen exponentiell mit größer werdender Wellenlänge ab.

Energiereiche UVC- und UVB-Strahlung verursachen durch ihre hohe Energiedichte ähnliche direkte Schäden an biologischen Molekülen wie DNA und Proteinen, indem sie kovalente Bindungen zwischen den Molekülen, die in diesem Bereich absorbieren, zerstören. Durch UVB entstehen vor allem Pyrimidin-Dimere und 6-4-Photoprodukte (6-4PPs) (Schmidt-Rose *et al.*, 1999). Die Bestrahlung von DNA bei 254 nm (UVC) verursacht in der Mehrzahl Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs) (71 %) und in geringerem Maße 6-4PPs (24 %; Douki und Cadet, 2001). Thymin-Glycole besitzen einen Anteil von 3-4 %, Cytosin-Hydrate, 8-oxo-Guanin, ESBs und DNA-Protein-Crosslinks liegen in der Häufigkeit des Auftretens zwischen 0,1 und 2 % (Demple und Linn 1982, Peak *et al.*, 1987, Mitchell *et al.*, 1991, Doetsch *et al.*, 1995). Die Schäden nach Bestrahlung mit UVC (254 nm) sind somit anderer Art als IR-induzierte DSBs, wodurch sich auch die zelluläre Antwort von der nach IR unterscheidet.

Die Reparatur der nach UVC auftretenden Thymidin-Dimere erfolgt über Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER), wodurch kurzfristig einzelsträngige DNA-Bereiche entstehen, die mit RPA (*Replication Protein A*) bedeckt werden. Bis heute ist nicht geklärt, ob die Ausdehnung dieser ssDNA-Bereiche ausreicht, um ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related*) und die folgenden *Downstream*-Faktoren über dieses Signal zu aktivieren (Marini *et al.*, 2006).

Das Ergebnis eines langsam einsetzenden G1/S-Checkpoints nach IR war überraschend. Dies zeigt, dass das über ATM ablaufende *Signaling* in spät bestrahlten G1-Phase-Zellen nicht sehr effektiv ist. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte daher untersucht werden, wie sich eine Modifikation des *Signalings* durch Änderung der Schadensart auf die Regulation des G1/S-Checkpoints auswirkt. Letztlich sollte die zeitliche Regulation und das Checkpoint-*Signaling* mit in der G2-Phase bestrahlten Zellen nach IR und UVC-Bestrahlung verglichen werden.

5.2.1 Die zeitliche Regulation des G1/S-Checkpoints nach UVC-Bestrahlung

Zur Charakterisierung der zeitlichen Regulierung des G1/S-Checkpoints nach UVC-Bestrahlung wurden die Zelllinien 82-6hTert (WT), F02-98hTert (ATR-defizient) und AT7Bi bzw. AT1BR (ATM-defizient) verwendet. Dabei kamen erneut die Ansätze der EdU/BrdU-Markierung und der Durchflusszytometrie zum Einsatz.

In WT-Zellen und ATR-defizienten Zellen konnte nach IR in den ersten 4 h eine leichte Verlangsamung beim S-Phase-Eintritt, danach ein vollständiges Einsetzen des G1/S-Checkpoints beobachtet werden. Dagegen induzierten ATM-defiziente Zellen nach IR keinen G1/S-Checkpoint. Dies war zu erwarten, da der G1/S-Checkpoint ATM-abhängig ist und eine G1-Checkpoint-Defizienz in AT-Zellen nach IR nachgewiesen wurde (Nagasawa und Little, 1983, Lavin und Shiloh, 1997).

Im Gegensatz zu IR zeigten alle verwendeten Zelllinien nach UVC-Bestrahlung mit 6 J/m² und 12 J/m² einen sofortigen Arrest und ein erneutes Eintreten von G1-Phase-Zellen in die S-Phase nach 4 h bzw. 6 h. Diese Ergebnisse sind konsistent mit Beobachtungen von Loignon und Drobetsky

(2002), die nach Bestrahlung mit 10 J/m^2 einer BrdU-markierten, asynchronen Fibroblasten-Kultur ebenfalls eine sofortige Verzögerung des S-Phase-Eintritts der Zellen feststellten.

ATM-defiziente Zellen zeigten das gleiche Verhalten wie WT-Zellen beim Eintritt in die S-Phase, woraus geschlossen werden könnte, dass das Einsetzen des G1/S-Checkpoints nach UVC-Bestrahlung unabhängig von ATM ist. Kaufmann und Wilson (1994) beobachteten allerdings nach UVC-Bestrahlung mit 7 J/m^2 keine Verzögerung AT-defizienter Fibroblasten vor dem Eintritt in die S-Phase, was den hier gezeigten Daten widerspricht. Die Ursachen für diese Diskrepanz sind allerdings unklar. Die ATR-defizienten Zellen verhielten sich ebenfalls wie WT-Zellen. Lediglich bei der höchsten verwendeten Fluenz von 12 J/m^2 konnte beobachtet werden, dass die Zellen nach dem Arrest nach längeren Zeiten geringfügig schneller als WT-Zellen wieder in die S-Phase eintraten.

Es gibt verschiedene mögliche Mechanismen, die für diesen schnellen Arrest der G1-Zellen verantwortlich sein können. Einmal könnten die Zellen durch eine mechanische Blockierung der Replikationsgabeln oder des Replikationsstarts arretiert werden, oder es wurde ein Intra-S-Phase-Checkpoint aktiviert. Eine dritte Möglichkeit stellt ein sehr schnell ablaufendes Signaling und somit ein schnelles Einsetzen des G1/S-Checkpoints dar.

Mechanische Blockierung der Replikationsgabeln

Es könnte vermutet werden, dass über eine mechanische Blockierung der Replikationsgabeln Zellen nicht mehr weiter von der G1-Phase in die S-Phase bzw. innerhalb der S-Phase progressieren. Für eine mechanische Hemmung würde sprechen, dass mit 3 J/m^2 bestrahlte Zellen zunächst eine geringe Verzögerung gegenüber unbestrahlten Zellen zeigen, 6 h nach Bestrahlung aber plötzlich deutlich mehr S-Phase-Zellen als in der unbestrahlten Kontrolle vorhanden sind. Nach Bestrahlung mit 3 J/m^2 werden nur wenige Basenschäden induziert, die schnell repariert sind. Diese Zeit zur Reparatur würde die Zellen kurzfristig am Eintritt in die S-Phase hindern, sodass sie direkt am Übergang von der G1-Phase in die S-Phase akkumulieren. Sobald die Schäden repariert sind, treten die Zellen annähernd synchron in die S-Phase ein, wodurch sich zunächst die starke Erhöhung der S-Phase-Zellen ergibt. Dieses Modell könnte auch für die Verwendung höherer Fluenzen gelten. Da bei höheren Fluenzen mehr Schäden induziert werden, benötigen sie allerdings mehr Zeit zur Reparatur und treten entsprechend später in die S-Phase ein. Durch die verlängerte Reparaturzeit ergeben sich eventuell größere Schwankungen in der Reparaturgeschwindigkeit zwischen den einzelnen Zellen, wodurch der Eintritt in die S-Phase nicht mehr ganz synchron verläuft. 6-4PPs werden im Gegensatz zu CPDs sehr schnell repariert. Innerhalb der ersten 3 h nach Bestrahlung mit 10 J/m^2 werden bereits 80 % der induzierten 6-4PPs, hauptsächlich über GGR (*Global Genome Repair*) repariert. CPDs hingegen werden langsam durch GGR repariert; die Zeitangaben schwanken bei Verwendung unterschiedlicher Methoden zur Messung zwischen 4,5 h und 8 h bis zu 24-30 h nach Induktion mit $10\text{-}40 \text{ J/m}^2$. Die Reparaturkinetik von CPDs in Fibroblasten verläuft biphasisch, 20-30 % der Läsionen werden in den ersten 12 h, weitere 10-20 % in den folgenden 12 h repariert (Ehmann *et al.*, 1978, Roza *et al.*, 1990, Therrien *et al.*, 1999, Ura und Hayes, 2002). Die Geschwindigkeit der Reparatur der induzierten Schäden würde somit bestimmen, wann die Zellen wieder in die S-Phase bzw. durch die S-Phase progressieren. In diesem Modell wäre das Arretieren der G1-Zellen unabhängig von

Komponenten der DNA-Schadensantwort, sodass auch Zelllinien mit Defekten im *Signaling* der DNA-Schadensantwort arretieren.

Intra-S-Phase-Checkpoint

Neben einer mechanischen Blockierung besteht auch die Möglichkeit eines aktiv induzierten Checkpoints. Die bisherigen Experimente mit exponentiellen Zellen zeigten eine fluenzabhängige Unterbindung des S-Phase-Eintritts direkt nach UVC-Bestrahlung. Dieser Prozess wurde auch in ATM- und ATR-defizienten Zellen beobachtet. Es scheint, als wäre die Induktion des Checkpoints unabhängig von ATM und ATR. Bei genauerer Betrachtung der *DotPlots* der durchflusszytometrischen Analyse war zu erkennen, dass BrdU-positive S-Phase-Zellen nach Bestrahlung deutlich langsamer als unbestrahlte Zellen durch die S-Phase progressieren (Abb. 49), was auf das Einsetzen von Checkpoints in der S-Phase schließen lässt. Dabei verblieben BrdU-positive Zellen umso länger in der S-Phase, je höher die verwendete Fluenz der Bestrahlung war. Je länger der Intra-S-Phase-Checkpoint aufrecht erhalten blieb, desto später gelangten auch BrdU-negative G1-Phase-Zellen in die S-Phase. Sobald die BrdU-positiven Zellen der S-Phase weiter progressierten und der transiente Intra-S-Phase-Checkpoint aufgehoben wurde, gelangten vermehrt BrdU-negative Zellen von der G1- in die S-Phase. Die Zellen werden nicht über einen G1-Arrest an der Progression gehindert, sondern treten noch in die S-Phase ein. Dort findet allerdings eine sofortige Inhibierung der Replikation durch Intra-S-Phase-Checkpoints statt, wodurch die Zellen nicht genügend BrdU einbauen, um als S-Phase-Zellen erkannt zu werden.

Werden Zellen genotoxischem Stress ausgesetzt, während sie sich in der S-Phase befinden, induzieren sie keinen dauerhaften Arrest wie G1- oder G2-Phase-Zellen, sondern die Progression durch die S-Phase wird nur verzögert. Die Verzögerung wird dadurch eingeleitet, dass die Anlagerung von Initiationsproteinen an den Replikationsursprung verhindert wird (Falck *et al.*, 2002). Bei UVC-Bestrahlung und der vorherrschenden Induktion von ESBs und Basenschäden (CPDs und 6-4PPs), vermittelt ATR den Intra-S-Checkpoint. Der ATR-ATRIP-Komplex, Rad17-RFC und der 9-1-1-Komplex werden an mit RPA bedeckte, einzelsträngige Regionen an angehaltenen Replikationsgabeln gebracht. ATR phosphoryliert Chk1, dieses wiederum phosphoryliert Cdc25A, was zu einer Inaktivierung von CyclinE/Cdk2 führt (Sancar *et al.*, 2004). Innerhalb der S-Phase kann ATR somit durch das Auftreten von DNA-Schäden z. B. durch UVC-Bestrahlung aktiviert werden. Aber auch die Inhibierung der DNA-Replikation kann zur Aktivierung von ATR führen (Cliby *et al.*, 1998). Die Entkopplung der Polymerase- von der Helikase-Aktivität führt dabei schließlich zu einer Akkumulation einzelsträngiger DNA, somit verstärkter Bindung von RPA und nachfolgende Phosphorylierung von Chk1 durch ATR. Hierbei würde allerdings eine Abhängigkeit der Checkpoint-Induktion von ATR erwartet werden, was aber anhand der Daten nicht beobachtet werden konnte. Dies spricht dafür, dass neben einem *Signaling* über ATR noch andere Prozesse wie ein ATR-unabhängiges *Signaling* oder eine mechanische Hemmung eine Rolle spielen.

Es muss beachtet werden, dass die Zellen zum Zeitpunkt der UVC-Bestrahlung BrdU inkorporiert hatten. BrdU ist ein Photosensitizer, der DNA-Schäden verursachen und das Proliferationsverhalten beeinflussen kann. Allerdings wurden auch BrdU-negative Zellen ausgewertet, die dasselbe Verhal-

ten wie BrdU-positive Zellen zeigten. Daher kann ein Einfluss von BrdU auf die Ergebnisse ausgeschlossen werden.

Das Auftreten von CPDs oder anderen UVC-Schäden könnte ebenso die Transkription von für die Replikation wichtigen Genen hemmen, was zu einem niedrigen Level dieser Proteine führt und so die DNA-Replikation verzögert. Orren *et al.* (1995) zeigten, dass bei Bestrahlung der S-Phase mit 20 J/m^2 bestrahlte Zellen bis zu 7 h später in die G2-Phase gelangten als unbestrahlte Zellen. Während dieser Zeit war die Rate der Replikation, wahrscheinlich durch das Einsetzen eines Intra-S-Phase-Checkpoints oder die mechanische Blockierung der Replikationsgabeln durch UV-Schäden herabgesetzt. Dieser Arrest war allerdings nur transient.

G1/S-Checkpoint in exponentiellen Zellen

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigten, dass sich sowohl ATR- als auch ATM-defiziente Zellen nach UVC-Bestrahlung wie WT-Zellen verhielten. Die Zellen zeigten einen direkten Arrest, der sowohl unabhängig von ATR als auch ATM zu sein schien.

Dies ist konsistent mit Arbeiten von Ward *et al.* (2004) und Bomgarden *et al.* (2006), die keine ATR-abhängige Checkpoint-Antwort nach UV-Bestrahlung außerhalb der S-Phase detektieren konnten. Dem widersprechen Marini *et al.* (2006), die eine ATR-abhängige Checkpoint-Aktivierung nach UVC-Bestrahlung humaner Fibroblasten durch Phosphorylierung von Chk1 und p53 in der G1-Phase des Zellzyklus nachweisen konnten. Zurzeit wird noch diskutiert, ob ATR außerhalb der S-Phase aktiviert werden kann. Es ist noch nicht vollständig geklärt, ob Checkpoint-Proteine in der Lage sind, direkt an UV-geschädigte DNA ohne vorherige Prozessierung der Läsionen zu binden (Jiang und Sancar, 2004). Schließlich spielt noch die NER über die Entstehung einzelsträngiger DNA-Bereiche bei der Reparatur von DNA-Schäden z.B. nach UV-Bestrahlung eine Rolle bei der Aktivierung von ATR (O'Driscoll *et al.*, 2003). Für eine Aktivierung von ATR über NER spricht, dass in allen Zellzyklus-Phasen Reparatur über NER nach Auftreten von DNA-Schäden stattfinden kann. Es wurde gezeigt, dass die Transfektion einer Kinase-toten Form von ATR in humane Fibroblasten nach Bestrahlung mit UV als auch IR zu einem Verlust der Checkpoint-Kontrolle führt (Wright *et al.*, 1998) und ATR-defiziente Zellen eine beeinträchtigte DNA-Schadensantwort nach UV-Bestrahlung zeigen (O'Driscoll *et al.*, 2003). Dies konnte in dieser Arbeit nicht direkt nachgewiesen werden. In den durchgeführten Experimenten dieser Arbeit zeigte sich zwar eine fluenzabhängige Verlangsamung des S-Phase-Eintritts, was jedoch auch bei der ATR-defizienten Zelllinie der Fall war, die nach UVC-Bestrahlung einen Verlust der Checkpoint-Funktion aufzeigen sollte.

Die zeitliche Regulation des G1/S-Checkpoints zeigte unter den hier gewählten Versuchsbedingungen eine große Ähnlichkeit zu der des Intra-S-Phase-Checkpoints. Möglicherweise laufen nach einer UVC-Bestrahlung von G1-Phase-Zellen ähnliche Signalkaskaden ab wie nach Bestrahlung von S-Phase-Zellen. Dies würde letztendlich zu einem ähnlichen Arrest der Zellen beider Zellzyklus-Phasen führen.

Hier stellt sich letzten Endes die Frage, ob die Daten dieser Arbeit einen wirklichen G1/S-Checkpoint, einen Intra-S-Checkpoint oder Effekte mechanischer Blockierung zeigen. Denkbar ist auch eine Kombination aller Möglichkeiten. Loignon und Drobetsky (2002) gehen z.B. bei der G1/S-

Checkpoint-Aktivierung nach UV-Bestrahlung von einem aktiv regulierten Mechanismus aus. Begründet wird diese Annahme dadurch, dass ein nach 10 J/m^2 gemessener G1-Arrest mit bis zu 24 h länger dauert, als die Zeit, die benötigt wird, um DNA-Läsionen über die NER zu beseitigen. Die Reparaturzeit aller Läsionen während eines G1-Arrestes wurde hier mit 6 h bis 8 h angegeben.

G1/S-Checkpoint in synchronisierten Zellen

Es wäre möglich, dass Intra-S-Phase-Checkpoints oder die physikalische Blockierung der Replikationsgabeln den Eintritt von in G1-bestrahlten Zellen in die S-Phase unterbinden. Somit konnte bislang nicht differenziert werden, ob die Zellen in der G1-Phase arretiert sind oder eine Inhibierung der Replikation vorlag. Mit dem folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob ein Checkpoint-*Signaling* initiiert wird.

WT-Zellen, ATM- und ATR-defiziente Zellen wurden durch die Kultivierung in Mangelmedium in der G0-Phase synchronisiert und direkt nach Serumzugabe bestrahlt. EdU befand sich über die gesamte Dauer des Versuchs im Medium. So erfolgte ein kontinuierlicher Anstieg EdU-positiver S-Phase-Zellen über den gesamten Zeitraum des Versuchs. Der Eintritt von unbehandelten Zellen in die S-Phase konnte 10 bis 12 h nach Zugabe des serumhaltigen Mediums beobachtet werden.

Die Zellen hatten durch diesen Versuchsansatz genügend Zeit zur Reparatur der UVC-induzierten Läsionen, trotzdem zeigte sich eine Verzögerung beim Eintritt von in der G1-Phase bestrahlten Zellen in die S-Phase. Dies könnte auf ein aktives Checkpoint-*Signaling* hindeuten. Da der Eintritt in die S-Phase in WT-Zellen und ATR-defizienten Zellen ähnlich war, scheint das *Signaling* unabhängig von ATR zu sein.

Kaufmann und Wilson (1994) bestrahlten synchronisierte humane Fibroblasten mit $3,5 \text{ J/m}^2$ und wiesen eine Verzögerung des S-Phase-Eintritts von 2-3 h nach. Bei Bestrahlung mit 7 J/m^2 verlängerte sich die Verzögerung entsprechend. Auch hier wurde eine fluenzabhängige Verringerung des S-Phase-Eintritts beobachtet. Das Ergebnis dieser Arbeitsgruppen stimmt mit den in der Arbeit gefundenen Zeiten der Verzögerung des S-Phase-Eintritts überein. Orren *et al.* (1995) wiesen in synchronisierten Hamsterzellen ebenfalls eine dosisabhängige Verzögerung des S-Phase-Eintritts bestrahlter G1-Phase-Zellen bis zu einer Fluenz von 20 J/m^2 einen Arrest von 6 bis 8 h nach. Erklärungen der Arbeitsgruppe für die Verzögerung sind zum einen, dass CPDs oder weitere Basenschäden die Transkription von Genen, welche für die DNA-Replikation benötigt werden, in der späten G1-Phase verhindern. Zum anderen wäre es möglich, dass UV-induzierte DNA-Schäden die Replikation mechanisch zu einem sehr frühen Zeitpunkt verhindern und aus diesem Grund keine DNA-Synthese nachweisbar ist. Diese Möglichkeit wird allerdings für unwahrscheinlich gehalten, da nicht davon ausgegangen wird, dass ein G1-Arrest über 6-8 h allein durch die physikalische Blockierung der Replikationsgabeln zustande kommt. Durch die hier angewendete Methode wird 10 bis 12 h Zeit zur Reparatur zur Verfügung gestellt, in der die meisten Schäden, vor allem 6-4PPs, repariert sein sollten. Außerdem bringt die direkte Bestrahlung von S-Phase-Zellen mit der gleichen Fluenz nur eine Verlangsamung der Syntheserate und keine vollständige Inhibierung mit sich. In humanen Zellen konnte nach UV-Bestrahlung bereits nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von Replikons und damit eine nachweisbare DNA-Synthese ausbleibt. Replikons sind DNA-Einheiten, welche von einem

Origin ausgehend als Einheit transkribiert werden können (Kaufman und Cleaver, 1981, Painter, 1985).

Um alternative *Signaling*-Wege zu untersuchen, wurden die Zellen zusätzlich mit ATM-Inhibitor (ATMi) behandelt. Da die bisherigen Untersuchungen in verschiedenen Zelllinien mit unterschiedlich genetischem Hintergrund durchgeführt wurden, konnte durch die Zugabe des ATMi der gleiche Effekt in allen Zellen erwartet werden.

In ATM-defizienten Zellen ohne Inhibitor zeigte sich wie bei WT-Zellen und ATR-defizienten Zellen eine Verzögerung beim Eintritt von bestrahlten G1-Phase-Zellen in die S-Phase. Allerdings bewirkte die Zugabe von ATMi zu WT-Zellen als auch zu ATR-defizienten Zellen nach Bestrahlung mit 6 J/m^2 einen verstärkten Eintritt von G1-Zellen in die S-Phase im Vergleich zu unbehandelten, mit 6 J/m^2 bestrahlten Zellen. Dies deutet darauf hin, dass ATM bei der Checkpoint-Aktivierung nach UVC-Bestrahlung eine Rolle spielt. Die Inhibierung von ATM in der ATR-defizienten Zelllinie erreicht kein vollständiges Aufheben des Checkpoints. Verglichen mit dem bestrahlten und ATMi-behandelten WT zeigt sich ein ähnlich starker Eintritt von Zellen in die S-Phase. Eine Abhängigkeit von ATR konnte auch in diesem Ansatz nicht direkt beobachtet werden. Es wäre möglich, dass die vorhandene Restaktivität von ATR in F02-98hTert Zellen einen Einfluss auf den Checkpoint hat. Jedoch konnte nachgewiesen werden, dass das Level relativ gering ist. Bei Patienten mit Seckel-Syndrom sind trotz dieser Restaktivität massive Symptome zu erkennen, wodurch deutlich wird, dass diese Restaktivität von ATR wahrscheinlich nicht ausreichend ist, um zelluläre Prozesse normal zu regulieren.

Da trotz Inhibierung von ATM und einer evtl. nur geringen Aktivität von ATR die Werte der unbestrahlten Kontrollen nicht erreicht wurden, könnte dies für zusätzliche Faktoren oder alternative Signalwege, unabhängig von ATM/ATR sprechen, die beim Einsetzen des G1/S-Checkpoints in UVC-bestrahlten Zellen eine Rolle spielen. In AT-defizienten Keratinozyten (Zellen der Oberhaut) konnte beispielsweise nach UVB-Bestrahlung innerhalb 1 h das Protein TRIM29 (TRi-partite Motif familiy 29) nachgewiesen werden. Dieses Protein wurde in Zellen von AT-Patienten entdeckt und spielt eine Rolle bei der Differenzierung von Keratinozyten. Diskutiert wird ebenfalls eine Rolle bei der Karzinogenese in unterschiedlichen Organen. Für TRIM29 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es die Sensitivität von AT-Zellen gegenüber IR teilweise unterdrückt (Bertrand-Vallery *et al.*, 2010). Allerdings sind Keratinozyten resistenter gegenüber UV-Strahlung als z.B. Fibroblasten (D'Errico *et al.*, 2003) und könnten aufgrund der häufigen Exposition gegenüber UV alternative Signalwege gegenüber Schäden nach UV-Bestrahlung entwickelt haben. Es könnte auch die Möglichkeit bestehen, dass die Signalwege zur Initiation eines Checkpoints nicht zwingend bei ATM und ATR einsetzen müssen, sondern dass ATM und ATR umgangen werden und *Downstream*-Faktoren direkt aktiviert werden. Für die Aktivierung des G2/M-Checkpoints nach IR besteht wohl ein alternativer, ATM- und ATR-unabhängiger Signaltransduktionsweg zur Arretierung der Zellen. Involviert sind BRCA1 und p53, welche nachfolgend p21, Gadd45 α und 14-3-3 σ aktivieren und so ein G2-Arrest induziert wird (Aprelikova *et al.*, 2001, Taylor und Stark, 2001). Vielleicht wäre ein solcher Signalweg auch für die Aktivierung eines G1/S-Checkpoints denkbar. Durch die Untersuchung von Tumorzellen konnten weitere Signalwege über die Proteine Akt und mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) aufgedeckt werden, welche den Zellzyklus beeinflussen können. Akt ist eine Proteinkinase, zählt zu den Onko-

genen und spielt eine wichtige Rolle in der Homöostase von Zellen. mTOR ist ein Mitglied der *Phosphoinositide 3-kinase-related kinase* (PIKK)-Familie, wie auch ATR, ATM und DNA-PK. Nach UVC-Behandlung von Zellen konnte eine verstärkte Phosphorylierung des Translationsinhibitors eIF2 α beobachtet werden, was zu einer Induktion der Signalwege mTOR und Akt über PI3K (*Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase*) führte. Akt wird von mTOR phosphoryliert und damit aktiviert, dieser Aktivierung kann der Tumorsuppressor PTEN entgegenwirken. Akt wirkt direkt auf die Cdk-Inhibitoren p21 und p27 und indirekt auf die Level von CyclinD1 und p53 (Levine *et al.*, 2006, Popowski *et al.*, 2008). Auch über diesen Weg könnte Einfluss auf das Checkpoint-Verhalten von Zellen nach UV-Bestrahlung genommen werden.

5.2.2 H2AX-Phosphorylierung von UVC-bestrahlten G1-Phase Zellen

Die alleinige Untersuchung des Checkpoint-Verhaltens von ATM- und ATR-defizienten Mutanten lieferte keine eindeutigen Aussagen, ob ein *Signaling* nach UVC-Bestrahlung stattfindet. So sollte die Aktivierung dieser DNA-Schadensantwort-initiierenden Kinasen über die Phosphorylierung von H2AX untersucht werden.

Bei Untersuchung der γ -H2AX-Phosphorylierung in seruminhibierten G1-Phase-Zellen aller verwendeten Zelllinien konnte nach Bestrahlung mit 12 J/m² nur ein leichter Anstieg der Focianzahl nach 15 min, 18 h und 24 h im Vergleich zu unbestrahlten Zellen mit überwiegend 1 oder 2 Foci beobachtet werden. Somit könnte ausgeschlossen werden, dass die Foci einen Checkpoint induzieren. Allerdings zeigte sich nach 12 J/m² eine Erhöhung von Zellen mit pannukleärem Signal, einer flächigen H2AX-Phosphorylierung nach einer Reparaturzeit von 10 h, 18 h und 24 h. Die Anzahl von ATR-defizienten Zellen, die ein solches pannukleäres Signal zeigten, war um etwa ein Drittel niedriger als bei WT-Zellen und AT-defizienten Zellen. Hieraus könnte man schließen, dass das pannukleäre Signal möglicherweise ATR-vermittelt ist und durch die über den gesamten Zellkern verteilten ESBs, die nach UVC-Bestrahlung induziert wurden, entsteht.

Das Auftreten eines pannukleären Signals nach UVC-Bestrahlung wurde auch von Marti *et al.* (2006) beobachtet. Die flächige H2AX-Phosphorylierung, die von den Autoren beobachtet wurde, konnte nicht in Zusammenhang mit DSBs gebracht werden, da es auch keinen Nachweis für 53PB1- als auch Nbs1-Foci gab, die beide mit γ -H2AX kolokalisieren. Der Mechanismus und die Funktion der flächigen H2AX-Phosphorylierung nach UVC-Bestrahlung konnte noch nicht aufgeklärt werden. Allerdings wurde gezeigt, dass NER-Mutanten nicht fähig waren, eine solche H2AX-Phosphorylierung nach UVC-Bestrahlung in der G1-Phase auszuführen. Der Prozess der DNA-Reparatur scheint demnach notwendig für die Phosphorylierung zu sein und die Phosphorylierung wiederum für die Induktion und Aufrechterhaltung des Checkpoints. O'Driscoll *et al.* (2003) berichten davon, dass die Phosphorylierung von H2AX in F02-98-Zellen nach UV-Bestrahlung defekt war. Nach Bestrahlung mit 40 J/m² wurde allerdings auch hier in 20 % der Zellen ein eher flächiges Signal detektiert. Die leichte Zunahme von F02-98hTert-Zellen mit einer flächigen H2AX-Phosphorylierung und einer ausbleibenden Foci-Bildung konnte auch in dieser Arbeit, allerdings schon bei geringeren Fluenzen beobachtet werden.

Die Regulation von Checkpoints nach UVC-Bestrahlung scheint in vielen Punkten unterschiedlich zur Bestrahlung von Zellen mit IR zu sein. Die Rolle von ATR nach UVC-Bestrahlung konnte mit den hier durchgeführten Experimenten nicht eindeutig geklärt werden, aber durch das alleinige Fehlen von ATR wurde der G1/S-Checkpoint nicht vollständig aufgehoben. Bei der Signalerkennung und Weiterleitung könnten somit noch weitere Proteine bzw. Signalwege eine zentrale Rolle spielen.

5.2.3 Die Rolle von p53 bei der Induktion des G1/S-Checkpoints nach UVC-Bestrahlung

Es bestehen Hinweise aus der Literatur, aus welchen Gründen das Einsetzen des G1/S-Checkpoints nach Bestrahlung mit UVC und IR unterschiedlich ausfallen kann. Besonders deutlich wird dies im Fall von p53. Wie bereits festgestellt wurde, kann die Phosphorylierung von p53 je nach schädigendem Agens über verschiedene Wege und an unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen stattfinden (Maki und Howley, 1997, Chernov *et al.*, 1998). Ebenso ist die Kinetik der Induktion von p53 nach Bestrahlung mit UV und IR unterschiedlich (Lu und Lane, 1993). Lu *et al.* (1998) berichten auch von einer unterschiedlichen Modifizierung von p53 nach IR- oder UV-Bestrahlung.

Obwohl das p53-Level in humanen Zellen nach UV-Bestrahlung wie auch nach IR ansteigt (Kastan *et al.*, 1991, Zhan *et al.*, 1993), gibt es keinen direkten Beweis für einen p53-vermittelten G1-Arrest nach UVC-Bestrahlung. In unbestrahlten Zellen liegt p53 in einem niedrigen Level mit geringer Halbwertszeit vor. Dieses Level steigt nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien an und ist verantwortlich für eine Verzögerung oder einen Arrest am G1/S-Übergang. Der p53-abhängige Arrest scheint dabei über p21 und pRb vermittelt zu werden. Dieser Signalweg ist für die Schädigung der DNA mit IR relativ gut charakterisiert, offene Fragen bleiben aber bei Bestrahlung von Zellen mit UV. Al-Mohanna *et al.* (2001) gehen davon aus, dass zwei verschiedene Signalwege als Antwort auf Schäden durch IR und UV-Bestrahlung genutzt werden. Ein Hinweis ist die unterschiedliche Modifikation, Stabilisierung und Induktionskinetik von p53 nach UV-Bestrahlung und IR. p53 wird nach UV-Bestrahlung am Serin 392 phosphoryliert, einer anderen Phosphorylierungsstelle als nach IR (Lu *et al.*, 1998). Zudem ist eine Ubiquitinierung nach IR vorhanden, nach Bestrahlung mit UVC hingegen nicht (Maki und Howley, 1997). Die Zunahme des p53-Levels ist ab 2 h nach UV-Bestrahlung mit 10 J/m² und 50 J/m² zu erkennen, ein weiterer Anstieg findet bis 12 h statt, gefolgt von einem Plateau, welches bis 30 h nach Bestrahlung aufrecht erhalten wird. Die Induktion nach IR ist schon nach 1 h erkennbar, mit Maximum nach 2 h und einer Abnahme des Levels 3 h nach Bestrahlung. Die Induktion von p53 nach UV-Bestrahlung verläuft somit langsamer als nach IR, p53 ist aber über einen längeren Zeitraum nachweisbar. Nach IR wird p53 schneller induziert, aber auch schneller wieder abgebaut.

Mehrere Arbeiten zeigten nach UVC-Bestrahlung die Induktion eines G1-Arrestes oder einer Verzögerung des S-Phase-Eintritts von G1-Phase-Zellen in die S-Phase unabhängig von p53 (Al-Mohanna *et al.*, 2001, Loignon und Drobetsky, 2002, Attardi *et al.*, 2004). Zunächst wurden über Serumentzug und Aphidicolinbehandlung am G1/S-Übergang synchronisierte HeLa-Zellen mit inaktiviertem p53 mit 5, 10 und 20 J/m² UVC bestrahlt. Diese Zellen zeigten eine dosisabhängige Verzögerung des S-Phase-Eintritts von bis zu 12 h im Vergleich zu unbestrahlten Zellen. Die Autoren schlossen aus die-

sen Beobachtungen, dass neben einem p53-abhängigen Weg zur Induktion eines G1-Arrests nach UVC-Bestrahlung auch ein p53-unabhängiger existieren sollte, zumal nachgewiesen werden konnte, dass in p53-defizienten Zellen p21 aktiviert und ein G1-Arrest induziert wurde. Bei Vorhandensein von p53 konnte andererseits eine Stabilisierung und Aktivierung durch Phosphorylierung, möglicherweise auch über andere Abläufe als nach IR nachgewiesen werden (Chernov *et al.*, 1998). Die Beteiligung von p53 wird hier eher bei Reparatur-Prozessen als bei Checkpoint-Ereignissen gesehen. Welches Ereignis letztendlich für den p53-unabhängigen Checkpoint verantwortlich ist, konnte dabei nicht geklärt werden. Einen Schritt weiter gehen Loinon und Drobetsky (2002), indem sie zusätzlich Zelllinien testeten, die p53- und/oder p21-defizient waren, pRb mit einbezogen und sowohl exponentielle als auch konfluente Zellen mit UVC bestrahlten. So konnte eine p53-unabhängige Induktion von p21 in konfluenten Zellen, aber nicht in exponentiell wachsenden Zellen festgestellt werden. Ebenfalls wurde eine Beteiligung von pRb bei der Induktion eines UVC-abhängigen G1-Arrests ausgeschlossen. Dem gegenüber stehen einige Studien, die sowohl eine Induktion von p21 als auch Hypophosphorylierung von pRB beobachten und diesen Proteinen eine essentielle Rolle bei der Induktion eines G1-Arrests nach UVB oder UVC zuwiesen (Medrano *et al.*, 1995, Harrington *et al.*, 1998). Generell wird an einem aktiv regulierten, p53-unabhängigen Prozess festgehalten. Wobei allerdings eingeräumt wird, dass ein passiver Prozess der allgemeinen Inhibierung der mRNA-Synthese durch Blockierung der Transkription aktiver Gene aufgrund UVC-induzierter DNA-Schäden eine Rolle beim G1-Arrest spielt (Ljungman *et al.*, 1999). Loinon und Drobetsky (2002) schlagen einen weiteren Mechanismus für die Induktion eines p53-unabhängigen G1-Arrests vor, der über die Stimulation von Phosphatasen und/oder die Inhibierung von Cdk's und nachfolgende Hypophosphorylierung der mit pRb verwandten Proteine p107 und p130 läuft. Es wurde gezeigt, dass p107 nach UV-Bestrahlung schnell über die Phosphatase PP2A dephosphoryliert wird und die geringste Fluenz, um diese Antwort zu induzieren, 4 J/m^2 beträgt. Die Angabe von 4 J/m^2 als unterste Grenze, um einen G1-Arrest auszulösen, würde erklären, warum die in dieser Arbeit mit 3 J/m^2 bestrahlten Proben sich fast wie die unbestrahlte Kontrolle verhalten.

5.2.4 Der G2/M-Checkpoint nach UVC-Bestrahlung

Um den G2/M-Checkpoint und dessen genetische Abhängigkeit nach UVC-Bestrahlung zu untersuchen und zu charakterisieren, wurde zunächst das Einsetzen des Checkpoints nach IR- und nach UVC-Bestrahlung über die Auswertung des Mitotischen Index (MI) verglichen. Schon 1 h nach Bestrahlung mit 1 Gy und 2 Gy sank der MI aufgrund der G2/M-Checkpoint-Induktion bei der WT-Zelllinie (82-6hTert) und der ATR-defizienten Zelllinie (F02-98hTert) unabhängig von der applizierten Dosis ab. Es wurde bereits gezeigt, dass das Einsetzen des Checkpoints schon 1 h nach Bestrahlung mit IR gemessen werden kann und bei Bestrahlung zwischen 1-10 Gy dosisunabhängig ist (Xu *et al.*, 2002). Weiterhin zeigen diese Ergebnisse, dass das Einsetzen des G2/M-Checkpoints in diesem Dosisbereich und in der G2-Phase bestrahlte Zellen unabhängig von ATR ist. Bei ATM-defizienten AT7Bi-Zellen hingegen nahm der MI nach Bestrahlung kaum ab. Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen, da in Zellen von AT-Patienten nachgewiesen wurde, dass der G2/M-Checkpoint nach

Bestrahlung in der G2-Phase ATM-abhängig ist, da AT-Zellen nach Bestrahlung in der G2-Phase weiter in die Mitose eintraten (Nagasawa und Little, 1983, Beamish *et al.*, 1996, Xu *et al.*, 2002, Yan *et al.*, 2007, Melixetian *et al.*, 2009).

Durch Bestrahlung mit UVC wurde, wie auch nach IR, der G2/M-Checkpoint innerhalb 1 h induziert. Eine weitere Abnahme des MI konnte 2 h nach UVC-Bestrahlung festgestellt werden. Dabei zeigte sich eine Fluenzabhängigkeit bei der Induktion des G2/M-Checkpoints. Ein nahezu vollständiger Arrest bei WT-Zellen und AT7Bi-Zellen wurde erst bei der höchsten verwendeten Fluenz von 12 J/m² beobachtet. Wie WT- und AT-Zellen zeigte auch die Zelllinie F02-98hTert einen mit Zunahme der Fluenz abnehmenden MI. Allerdings waren die jeweiligen Checkpoint-Effekte bei Bestrahlung mit den entsprechenden Fluenzen deutlich geringer als bei den ATR-profizienten WT- und AT-Zellen (Abb. 51), was auf eine Beteiligung von ATR bei der Induktion des G2/M-Checkpoints nach UVC-Bestrahlung schließen lässt.

Trotz allem verläuft die Aktivierung des Checkpoints in WT-Zellen sowohl nach IR als auch nach UVC-Bestrahlung schnell und es wurde bereits gezeigt, dass durch UVC-Bestrahlung in frühen G2-synchronisierten Zellen ein fluenzabhängiger, kurzer G2-Arrest induziert wird (Orren *et al.*, 1995, Bulavin *et al.*, 2001). Franchitto *et al.* (1998) wiesen in Hamster-Zellen nach UVC-Bestrahlung mit 8 J/m² und 15 J/m² in der G2-Phase eine ebenfalls fluenzabhängige Abnahme des MI 1,5 h nach Bestrahlung und eine maximale Inhibierung des MI um 80 % der Gesamtzellzahl nach 2,5 h nach. Kürzlich wurde beobachtet, dass G2-Phase-Zellen nach Bestrahlung mit UV einen ATR-abhängigen G2/M-Checkpoint induzieren (Stiff *et al.*, 2008). Die Autoren erklären diese Beobachtung damit, dass nach UV-Bestrahlung vor allem Thymidin-Dimere und 6-4PPs als Schäden an der DNA auftreten, welche überwiegend über NER repariert werden. Während des Reparaturvorgangs wird der DNA-Schaden beiderseits der Läsion auf dem DNA-Strang über 24-32 Nukleotide ausgeschnitten. Es folgt die Anlagerung von RPA an den entstandenen einzelsträngigen Bereich, was als Signal für die Aktivierung von ATR gilt. Demzufolge sollten ATR-defiziente Zellen nicht mehr fähig sein, einen G2/M-Checkpoint nach UV-Bestrahlung zu aktivieren, was im Rahmen dieser Arbeit in der bei Stiff *et al.* (2008) beschriebenen Deutlichkeit nicht gefunden werden konnte.

Einen weiteren Hinweis für die Vermutung, dass ein Reparatur-Intermediat der NER in der Lage ist, den G2/M-Checkpoint zu aktivieren, lieferte die Untersuchung XPA-defizienter Zellen. Die Rekrutierung von XPA ermöglicht die Stabilisierung der entstehenden einzelsträngigen Region während des Reparaturvorgangs. War XPA nicht vorhanden, wurde keine Aktivierung von ATR beobachtet (Marini *et al.*, 2006, Stiff *et al.*, 2008). Entgegen dieser Meinung wurde diskutiert, dass eine ATR-Aktivierung nur in replizierenden Zellen erfolgen kann und die Checkpoint-Proteine fähig sind, auch ohne Prozessierung der Schäden durch NER direkt an die Läsionen zu binden (Ward *et al.*, 2004, Jiang und Sancar, 2006). Da in den durchgeführten Versuchen dieser Arbeit die Fixierung der Zellen bereits 1 h nach Bestrahlung erfolgte, kann ein Einfluss replizierender Zellen auf die Ergebnisse größtenteils ausgeschlossen werden. In der G2-Phase bestrahlte Zellen induzieren somit einen Checkpoint und es wäre möglich, dass dieser durch ATR-Aktivierung nach der Prozessierung durch NER aktiviert wurde.

Nach UVC-Bestrahlung zeigten ATM- und ATR-profiziente WT-Zellen den niedrigsten MI, ATM-defiziente Zellen einen etwas höheren MI und ATR-defiziente Zellen einen wiederum höheren MI. Entsprechend dieser Daten könnte gefolgert werden, dass neben ATR auch ATM einen zwar geringen, jedoch messbaren Anteil zur Induktion der Checkpoint-Antwort nach UVC-Bestrahlung beisteuert. Um dies zu überprüfen wurde ATM in WT-Zellen und F02-98hTert inhibiert. Die ATMi-Behandlung hatte keinen Einfluss auf das Checkpoint-Verhalten von AT7Bi-Zellen nach UVC-Bestrahlung. Dies war zu erwarten, da die Zellen bereits eine ATM-Defizienz aufweisen. Allerdings bewirkte die Zugabe von ATMi in 82-6hTert-Zellen eine leichte Erhöhung des MI nach Bestrahlung mit 6 J/m^2 und 12 J/m^2 im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf fast exakt die Werte, die AT7Bi-Zellen zeigten. Die Inhibierung von ATM führte bei F02-98hTert zur vollständigen Aufhebung des G2/M-Checkpoints auch nach hohen Fluenzen. Dies lässt vermuten, dass die Aktivierung des G2/M-Checkpoints nach UVC-Bestrahlung zwar zum größten Teil ATR-abhängig ist, ATM aber als zweite Kinase für eine vollständige Aktivierung des Checkpoints nach UVC-Bestrahlung benötigt wird (Abb. 53). Über eine γ -H2AX-Färbung wurde ausgeschlossen, dass ATM durch DSBs aktiviert wurde. Nach Bestrahlung konnte eine minimale Erhöhung der DSBs beobachtet werden. Da der G2/M-Checkpoint aber als eher insensitiv gilt, sollte die geringe Erhöhung der DSBs keinen Einfluss auf die Induktion des Checkpoints haben.

Es wurde nachgewiesen, dass ATM essentiell für die Vermittlung der Checkpoint-Kontrolle nach IR-Bestrahlung oder anderen Agenzien, welche die Induktion von DSBs bewirken, ist. ATM bewirkt die Phosphorylierung von Chk1, Chk2 und p53 (Helt *et al.*, 2005). Es gibt Hinweise darauf, dass ATM auch durch Änderung der Chromatinstruktur der DNA, einmal abhängig und einmal unabhängig von der Induktion von DSBs aktiviert werden kann (Bakkenist und Kastan, 2003, Helt *et al.*, 2005). Zusätzlich konnte eine Aktivität von ATM als Antwort auf UV-Bestrahlung nachgewiesen werden, was mit dem minimalen oxidativen Schaden durch UV-Bestrahlung in Zusammenhang stehen könnte (Tyrrell, 1991). Helt *et al.* (2005) zeigten, dass ATM nach UVC-Bestrahlung Chk2 phosphoryliert, wodurch ebenfalls ein Hinweis auf eine Aktivierung von ATM nach UV besteht. Die Untersuchung von AT-defizienten Zellen zeigte auch, dass die Defekte in der Prozessierung von UVC-Schäden im Zusammenhang mit dem ATM-Gen stehen und daher ATM in der Exzisions-Reparatur von UVC-induzierten DNA-Schäden eine Rolle zu spielen scheint (Hannan *et al.*, 2002). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass ATM benötigt wird, um nach UVC-Bestrahlung RPA zu hyperphosphorylieren (Oakley *et al.*, 2001). Daher könnte RPA das Bindeglied zwischen ATM und NER darstellen. Die Inhibierung von ATM würde sich so in einer schlechteren Aktivierung des G2/M-Checkpoints nach UVC-Bestrahlung äußern. Die Signalwege von ATR und ATM scheinen sich nach Bestrahlung mit UVC zu überlappen oder zu ergänzen, und möglicherweise wird eine gemeinsame Antwort auf genotoxischen Stress induziert (Helt *et al.*, 2005). Zudem ist bekannt, dass die Phosphorylierung und Aktivierung von ATM als Antwort auf UV-Bestrahlung oder Blockierung von Replikationsgabeln in der S-Phase ATR-abhängig ist (Stiff *et al.*, 2006). Die Beteiligung von ATM an der G2/M-Checkpoint-Antwort nach UVC könnte somit das leichte Einsetzen eines Checkpoint-Arrests in F02-98hTert-Zellen nach Bestrahlung mit Fluenzen von 6 J/m^2 und 12 J/m^2 ohne ATMi-Behandlung und den vollständigen Verlust des Checkpoints nach ATMi-Behandlung erklären.

Khanna und Lavin (1993) zeigten im Gegensatz dazu, dass ATM nicht als Antwort auf UV-Bestrahlung aktiviert wird. Dies konnte anhand der vorliegenden Daten nicht bestätigt werden.

5.2.5 Induktion von γ -H2AX in UVC-bestrahlten G2-Phase-Zellen

Die Antwort einer Zelle auf DSBs IR wurde bereits gut untersucht. Nach Erkennung des DSB über ATM erfolgt die Phosphorylierung von H2AX zu γ -H2AX innerhalb weniger Minuten. Über die Phosphorylierung von H2AX nach UVC-Bestrahlung sind z.T. sehr widersprüchliche Aussagen zu finden, weshalb die Phosphorylierung von H2AX als Indikator für eine ATM/ATR-Aktivierung in der G2-Phase nach UVC-Bestrahlung im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte.

1 h nach Bestrahlung von exponentiell wachsenden Zellen mit 3 J/m^2 und 6 J/m^2 wurde nur eine leichte Erhöhung der γ -H2AX-Foci in G2-Phase-Zellen im Gegensatz zu einer deutlichen Erhöhung der γ -H2AX-Foci nach 2 Gy beobachtet. Da der G2/M-Checkpoint unempfindlich ist und die hier festgestellten Focizahlen unterhalb der Sensitivitätsgrenze liegen, kann davon ausgegangen werden, dass die DSBs nicht verantwortlich für die Induktion des Checkpoints sind. Die ATM-Abhängigkeit des Checkpoints ist somit nicht über die DSB-Induktion erklärbar.

Einige Zellen zeigten nach UVC-Bestrahlung vermehrt neben einem leichten, pannukleären Signal auch einen stark leuchtenden Hintergrund. Diese Beobachtung wurde, teilweise in leicht unterschiedlicher Ausprägung, sowohl in den WT-Zellen, als auch in ATR- und ATM-defizienten Zellen gemacht. Das flächige Signal könnte durch die nach UVC-Bestrahlung induzierten ESBs und somit der Aktivierung von ATR entstanden sein.

In der Arbeit von Hanasoge und Ljungman (2007) wurden 6 h nach Bestrahlung von humanen Fibroblasten mit 5 J/m^2 und 20 J/m^2 γ -H2AX-Foci in Zellen unabhängig von der Zellzyklusphase gefunden. Bei 5 J/m^2 war nur ein Teil der Zellen positiv für γ -H2AX, bei 20 J/m^2 zeigten fast alle Zellen γ -H2AX-Foci. Die Autoren gehen von einer ATR-vermittelten H2AX-Phosphorylierung aus. Eine Möglichkeit für die Beobachtung von Foci in der G2-Phase ist die unsaubere Abtrennung dieser Populationen von der S-Phase, die nach UVC-Bestrahlung verstärkt Foci, bis hin zu einem starken, pannukleärem Signal aufweist. Zu dieser Ansicht gelangen auch Arbeiten, die eine Phosphorylierung von H2AX in exponentiellen Zellen nur in der S-Phase sehen (Matsumoto *et al.*, 2007) und annahmen, dass beim Auftreten von Foci in G1-Phase-Zellen die S-Phase-Population nicht sauber von der G1-Phase Population getrennt wurde (Zhao *et al.*, 2010). Die Ausbildung von γ -H2AX-Foci nach UVC-Strahlung lediglich in S-Phase-Zellen wird dadurch begründet, dass es sich bei den UVC-induzierten Schäden vor allem um Pyrimidin-Dimere, 6-4PPs und ESBs handelt. Bei der Replikation der DNA treffen Replikationsgabeln auf diese unreparierten Schäden, wodurch DSBs entstehen, die über γ -H2AX-Foci nachweisbar sind. Marti *et al.* (2006) fanden in Fibroblasten nach 20 J/m^2 UVC-Bestrahlung eine H2AX-Phosphorylierung in allen Zellzyklus-Phasen. Sie zeigte sich überwiegend als diffuse pannukleäre Färbung. Die Intensität des Signals war abhängig von der Phase des Zellzyklus. S-Phase-Zellen zeigten ein starkes, G1-Zellen ein schwaches pannukleäres Signal. Innerhalb der G1-Phase wurde H2AX in Abwesenheit von DSBs phosphoryliert. Zusätzlich konnte auch eine unterschiedliche Kinetik der H2AX-Phosphorylierung nach UVC und nach IR festgestellt werden. Nach IR

war die maximale Phosphorylierung nach 30 min erreicht und nahm schnell ab. Nach UVC-Bestrahlung erreichte die Phosphorylierung das Maximum nach 2 h und blieb über 4 h erhalten. Erst zwischen 4 h und 8 h begann eine Abnahme des Signals. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die Phosphorylierung abhängig von NER ist. In XPA- und XPC-defizienten Zellen (Reparaturfaktoren der NER) wurde nur ein stark abgeschwächtes Signal im Vergleich zu WT-Zellen gefunden.

Es wäre möglich, dass nach UVC-Bestrahlung zunächst Schäden entstehen, CPDs und 6-4PPs, welche über NER repariert werden. Die dabei entstehenden einzelsträngigen Bereiche werden durch RPA bedeckt, was wiederum ein Signal für ATR darstellt, welches nachfolgend H2AX phosphoryliert. In den verwendeten Zelllinien wurde generell nur ein leichter Anstieg von γ -H2AX nach UVC-Bestrahlung beobachtet. Da γ -H2AX als Indikator für die Aktivierung von ATM und ATR dient, kommt die Frage auf, ob dieses geringe Signal alleine für die Induktion eines Checkpoints ausreicht. Von Bedeutung für die Induktion des Checkpoints nach UV-Bestrahlung ist möglicherweise wiederum die pannukleäre Phosphorylierung von H2AX wie bereits in Kapitel 5.2.2 beschrieben. Es wäre außerdem möglich, dass neben der DNA-Schädigung auch andere zelluläre Vorgänge zu einer Änderung der Zellzyklus-Kontrolle führen könnten. So wurde z.B. beschrieben, dass Membrangekoppelte Rezeptoren wie p38-Kinase (Bulavin *et al.*, 2001) und JNKs (*Jun amino terminal kinase*) (Gutierrez *et al.*, 2010) weitere Faktoren zur Aktivierung des G2/M-Checkpoints nach UV-Bestrahlung darstellen könnten. JNKs spielen eine Rolle bei der Phosphorylierung von Substraten, die in der Kontrolle von Zellzyklus, Proliferation und Differenzierung der Zellen involviert sind. Die genauen Mechanismen bei der Kontrolle des Zellzyklus sind noch weitgehend unbekannt, aber man geht davon aus, dass Cdc25C über Phosphorylierung durch JNK inaktiviert wird. Die Phosphorylierung wirkt sich negativ auf die Aktivität von Cdk1 aus und ein G2/M-Checkpoint wird induziert (Gutierrez *et al.*, 2010). Die p38-Kinase scheint ebenfalls wichtig bei der Induktion eines G2/M-Checkpoints nach UV-Bestrahlung zu sein. p38 wird als früher Sensor beschrieben, der die Phosphorylierung von Cdc25B reguliert. Über diese Signalwege wäre es möglich, auch ohne die Aktivierung von ATM/ATR und schließlich der H2AX-Phosphorylierung direkt auf die Cdc25-Phosphatasen einzuwirken. Dagegen wird vermutet, dass Signalwege über ATM und ATR für die Aufrechterhaltung des Checkpoints eine wichtige Rolle spielen (Bulavin *et al.*, 2001). Zur Aufrechterhaltung können aufgrund der vorliegenden Daten keine Aussagen gemacht werden, da die Zellen nur bis 2 h nach Bestrahlung analysiert wurden.

Zusammenfassend zeigte sich nach UVC-Bestrahlung der Zellen sowohl ein schnell einsetzender G1/S- als auch ein schnell einsetzender G2/M-Checkpoint. Durch die Induktion von CPDs und 6-4PPs und damit der Modifizierung des *Signalings* konnte somit eine abweichende Regulation des G1/S-Checkpoints im Vergleich zu IR beobachtet werden. Nach IR und der Induktion von DSBs zeigte sich im Gegensatz zu UVC-Bestrahlung ein langsam einsetzender G1/S-Checkpoint. Eine möglicherweise abweichende zeitliche Regulation des G2/M-Checkpoints nach UVC-Bestrahlung im Gegensatz zu IR konnte in Bezug auf das Einsetzen nicht festgestellt werden. Auch nach IR wurde der G2/M-Checkpoint schnell induziert. Unterschiede zwischen UVC-Bestrahlung und IR ergeben sich bei Betrachtung der G2/M-Checkpoint-Induktion bezüglich der Beteiligung von ATM und ATR. Nach IR ist

dieser Checkpoint ATM-abhängig, aber ATR-unabhängig. Nach UVC-Bestrahlung zeigt sich eine Abhängigkeit sowohl von ATR als auch von ATM. Der G1/S-Checkpoint zeigte nach IR ebenfalls eine ATM- und keine ATR-Abhängigkeit. Nach Bestrahlung mit UVC konnte nur bedingt eine ATR- und eine leichte ATM-Abhängigkeit festgestellt werden.

Zum Thema der Zellzyklus-Regulation von Säugerzellen nach UV-Bestrahlung wurde bisher eine Vielzahl von Studien veröffentlicht, wobei aber immer noch viele Fragen ungeklärt bleiben bzw. sich Standpunkte widersprechen. Ein Grund hierfür kann einmal die Verwendung unterschiedlichster Zellsysteme von Maus bis Mensch und von Tumor- bis zu Fibroblastenzellen mit den unterschiedlichsten Eigenschaften und Defekten darstellen. Zum anderen sollte nach Bestrahlung mit monochromatischem UVC (254 nm) und polychromatischem UVB (290-320 nm) unterschieden werden. Die in der Mehrheit auftretenden Schäden sind zwar ähnlich (CPDs und 6-4PPs), jedoch könnten auch geringe Unterschiede in Anzahl und Art der Schäden eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschweren oder unmöglich machen. Die Bestrahlung mit UVC erfolgte meist in einem Bereich zwischen 5 J/m^2 und 40 J/m^2 , wobei nicht immer abgeschätzt werden konnte, ob und welche zusätzlichen Effekte durch die Bestrahlung mit einer höheren Fluenz entstehen. Ein weiterer Punkt ist die Beachtung der verwendeten Methoden. So konnten bei Bestrahlung seruminhibierter oder konfluenter Zellen gegensätzliche Beobachtungen zur Bestrahlung von exponentiell wachsenden Zellen, z.B. in Bezug auf das Einsetzen eines Checkpoints, gemacht werden. Direkte Vergleiche zwischen den unterschiedlichen Studien sind daher nur bedingt möglich.

5.3 Ausblick

Durch die Verwendung unterschiedlicher Methoden konnte der zeitliche Verlauf der Regulation des G1/S-Checkpoints charakterisiert und zugleich seine Limitierungen aufgedeckt werden. Es wurde gezeigt, dass der G1/S-Checkpoint in den ersten Stunden nach IR keinen vollständigen Arrest induziert, wodurch Zellen mit unreparierten Brüchen weiter im Zellzyklus progressieren, was letztendlich zu Chromosomenbrüchen in der G2-Phase führen kann (Deckbar *et al.*, 2010). Diese Ergebnisse führen zu der Frage nach den mechanistischen Ursachen für das langsame Einsetzen eines G1-Arrestes. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass G1-bestrahlte Zellen durch die gesamte S-Phase ein höheres Level an DSBs aufweisen. Dabei ermöglichte die Methode des LCI erstmals die separate Verfolgung von IR-induzierten und replikationsassoziierten DSBs. Interessanterweise stellte sich heraus, dass strahleninduzierte DSBs im Verlauf der S-Phase fast vollständig repariert werden und das erhöhte Level an DSBs am Ende der S-Phase durch replikationsassoziierte DSBs zustande kommt, die im Verlauf der S-Phase gebildet wurden. In weiterführenden Studien könnten Einblicke in die Mechanismen der DSB-Reparatur während der S-Phase gewonnen und gegebenenfalls grundlegende Unterschiede in der Reparatur IR-induzierter und replikationsassoziiertter DSBs aufgezeigt werden. Bei Verfolgung der strahleninduzierten und replikationsassoziierten DSBs durch die S-Phase könnte über die Methode des LCI der Anteil von HR und NHEJ an den jeweiligen Arten der DSBs ersichtlich werden. Dies gelingt beispielsweise durch Akkumulation

Fluorochrom-gekoppelter HR-Faktoren wie Rad54 oder NHEJ-Faktoren wie DNA-LigaselV an den entsprechenden DSBs.

Diese Arbeit untersuchte ausschließlich das Verhalten bestrahlter G1-Phase-Zellen innerhalb eines Zellzyklusses. Bei weiterer Verfolgung der Zellen über mehrere Zellzyklen ließe sich untersuchen ob und wie viele Zellen in nachfolgenden Zellzyklen arretiert werden (Leonardo *et al.*, 1994). Wie schon beschrieben, entsprach das Verhalten des G1/S-Checkpoints direkt nach Bestrahlung nicht den Vorstellungen eines „Master-Checkpoints“, der Zellen schon mit wenigen DSBs aus der aktiv proliferierenden Kultur entfernt (Huang *et al.*, 1996, Yamauchi *et al.*, 2008). Allerdings scheint es, dass Zellen in der G1-Phase des zweiten Zellzyklus nach Bestrahlung arretiert werden (Linke *et al.*, 1997). Während der Progression durch einen gesamten Zellzyklus sollten nahezu alle DSBs repariert sein, wenn die Zelle zum zweiten Mal nach Bestrahlung in die G1-Phase eintritt. Mit Hilfe des LCI kann bestimmt werden, mit wie vielen Foci die Zellen in der folgenden G1-Phase arretiert werden, oder ob andere schadensabhängige Mechanismen zu einem permanenten Arrest führen.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach UVC-Bestrahlung sowohl der G1/S- als auch der G2/M-Checkpoint innerhalb einer Stunde einsetzen und Zellen in der G1- und der G2-Phase arretiert werden. Im Gegensatz zu IR arretieren Zellen nach UVC somit direkt nach Bestrahlung in der G1-Phase. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Regulation nach UVC grundsätzlich verschieden von IR ist. Hier werden weitere Untersuchungen nötig sein, um die zellulären Vorgänge aufzuklären. Da es sowohl für den p53-abhängigen als auch für einen p53-unabhängigen Checkpoint Hinweise gibt (Ward *et al.*, 2004, Marini *et al.*, 2006), könnte die p53-Abhängigkeit des G1/S-Checkpoints nach UVC-Bestrahlung überprüft werden. Ebenso kann die Abhängigkeit von ATM und ATR bzw. weiterer Faktoren auf dieser Ebene noch detaillierter untersucht werden. Eine Frage, die im Zusammenhang mit UVC-Bestrahlung der Zellen nicht erörtert wurde, ist die Regulierung von Faktoren, die *Downstream* von ATM und ATR operieren. Da die zelluläre Regulation des G1/S-Checkpoints nach IR und UVC-Bestrahlung sich völlig unterscheidet, sind wahrscheinlich auch die Ereignisse auf molekularer Ebene anders reguliert.

6 Literaturverzeichnis

Internetquellen:

www.onmeda.de/lexika/strahlenmedizin

www.institut-heidger.de

Sonstige Quellen:

Aboussekhra, A., M. Biggerstaff, M. K. Shivji, J. A. Vilpo, V. Moncollin, V. N. Podust, M. Protic, U. Hubscher, J. M. Egly and R. D. Wood. 1995. Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* 80:859-868.

Abraham, R. T. 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 15:2177-2196.

Adams, K. E., A. L. Medhurst, D. A. Dart and N. D. Lakin. 2006. Recruitment of ATR to sites of ionising radiation-induced DNA damage requires ATM and components of the MRN protein complex. *Oncogene* 25:3894-3904.

Adams, M. M. and P. B. Carpenter. 2006. Tying the loose ends together in DNA double strand break repair with 53BP1. *Cell Div.* 1:19.

Allan, L. A. and M. Fried. 1999. p53-dependent apoptosis or growth arrest induced by different forms of radiation in U2OS cells: p21WAF1/CIP1 repression in UV induced apoptosis. *Oncogene* 18:5403-5412.

Al Mohanna, M.A., F.M. Al Khodairy, Z. Krezolek, P.A. Bertilsson, K.A. Al Houssein and A. Aboussekhra. 2001. p53 is dispensable for UV-induced cell cycle arrest at late G(1) in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 22, 573-578.

Amouroux, R., A. Campalans, B. Epe and J. P. Radicella. 2010. Oxidative stress triggers the preferential assembly of base excision repair complexes on open chromatin regions. *Nucleic Acids Res.* 38:2878-2890.

Aprelikova, O., A. J. Pace, B. Fang, B. H. Koller and E. T. Liu. 2001. BRCA1 is a selective co-activator of 14-3-3 sigma gene transcription in mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 276:25647-25650.

Araujo, S. J., F. Tirode, F. Coin, H. Pospiech, J. E. Syvaoja, M. Stucki, U. Hubscher, J. M. Egly and R. D. Wood. 2000. Nucleotide excision repair of DNA with recombinant human proteins: definition of the minimal set of factors, active forms of TFIIH, and modulation by CAK. *Genes Dev.* 14:349-359.

Attardi, L. D., A. de Vries and T. Jacks. 2004. Activation of the p53-dependent G1 checkpoint response in mouse embryo fibroblasts depends on the specific DNA damage inducer. *Oncogene* 23:973-980.

Avantaggiati, M. L., V. Ogryzko, K. Gardner, A. Giordano, A. S. Levine and K. Kelly. 1997. Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* 89:1175-1184.

Bakkenist, C. J. and M. B. Kastan. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421:499-506.

Barnes, D. E. and T. Lindahl. 2004. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu. Rev. Genet.* 38:445-476.

Bartek, J. and J. Lukas. 2001. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:738-747.

Bartek, J. and J. Lukas. 2001. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett.* 490:117-122.

Bartek, J., C. Lukas and J. Lukas. 2004. Checking on DNA damage in S phase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:792-804.

Bassett, E., N. M. King, M. F. Bryant, S. Hector, L. Pendyala, S. G. Chaney and M. Cordeiro-Stone. 2004. The role of DNA polymerase eta in translesion synthesis past platinum-DNA adducts in human fibroblasts. *Cancer Res.* 64:6469-6475.

Batista, L.F., B. Kaina, R. Meneghini and C.F. Menck. 2009. How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. *Mutat. Res.*, 681, 197-208.

Batty, D. P. and R. D. Wood. 2000. Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene* 241:193-204.

Baumann, P., F. E. Benson and S. C. West. 1996. Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell* 87:757-766.

Beamish, H., R. Williams, P. Chen and M. F. Lavin. 1996. Defect in multiple cell cycle checkpoints in ataxia-telangiectasia postirradiation. *J. Biol. Chem.* 271:20486-20493.

Bekker-Jensen, S., C. Lukas, F. Melander, J. Bartek and J. Lukas. 2005. Dynamic assembly and sustained retention of 53BP1 at the sites of DNA damage are controlled by Mdc1/NFBD1. *J. Cell Biol.* 170:201-211.

- Bekker-Jensen, S., C. Lukas, R. Kitagawa, F. Melander, M. B. Kastan, J. Bartek and J. Lukas. 2006.** Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J. Cell Biol.* 173:195-206.
- Bertani, G. 1951.** Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 62, 293-300.
- Bertrand-Vallery, V., N. Belot, M. Dieu, E. Delaive, N. Ninane, C. Demazy, M. Raes, M. Salmon, Y. Poumay, F. Debacq-Chainiaux and O. Toussaint. 2010.** Proteomic profiling of human keratinocytes undergoing UVB-induced alternative differentiation reveals TRIPartite Motif Protein 29 as a survival factor. *PLoS. One.*, 5, e10462.
- Beucher, A., J. Birraux, L. Tchouandong, O. Barton, A. Shibata, S. Conrad, A. A. Goodarzi, A. Krempler, P. A. Jeggo and M. Lobrich. 2009.** ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *EMBO J.*, 28, 3413-3427.
- Beukers, R. and W. Berends. 1960.** Isolation and identification of the irradiation product of thymine. *Biochim. Biophys. Acta* 41:550-551.
- Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523.
- Blackwell, L. J., D. Martik, K. P. Bjornson, E. S. Bjornson and P. Modrich. 1998.** Nucleotide-promoted release of hMutSal-pha from heteroduplex DNA is consistent with an ATP-dependent translocation mechanism. *J. Biol. Chem.* 273:32055-32062.
- Blomen, V. A. and J. Boonstra. 2007.** Cell fate determination during G1 phase progression. *Cell Mol. Life Sci.* 64:3084-3104.
- Boag, J. W. and W. W. Seelentag. 1975.** A general saturation curve for an ionization chamber filled with nitrogen at pressures up to 8 atmospheres. *Phys. Med. Biol.*, 20, 624-626.
- Boder, E. 1975.** Ataxia-telangiectasia: some historic, clinical and pathologic observations. *Birth DefectsOrigArtic Ser* 11 (1), 255-270.
- Bodnar, A. G., M. Ouellette, M. Frolkis, S. E. Holt, C. P. Chiu, G. B. Morin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. Lichtsteiner and W. E. Wright. 1998.** Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279:349-352.
- Bohr, V. A., C. A. Smith, D. S. Okumoto and P. C. Hanawalt. 1985.** DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* 40:359-369.
- Bomgarden, R. D., P. J. Lupardus, D. V. Soni, M. C. Yee, J. M. Ford and K. A. Cimprich. 2006.** Opposing effects of the UV lesion repair protein XPA and UV bypass polymerase eta on ATR checkpoint signaling. *EMBO J.* 25:2605-2614.
- Boonstra, J. 2003.** Progression through the G1-phase of the on-going cell cycle. *J. Cell Biochem.*, 90, 244-252.
- Boonstra, J. 2007.** Identification of a restriction point at the M/G1 transition during the ongoing cell cycle. *Adv. Enzyme Regul.*, 47, 208-221.
- Bravo, R., R. Frank, P. A. Blundell and H. Macdonald-Bravo. 1987.** Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 326:515-517.
- Brendler-Schwaab, S., A. Czich, B. Epe, E. Gocke, B. Kaina, L. Muller, D. Pollet and D. Utesch. 2004.** Photochemical genotoxicity: principles and test methods. Report of a GUM task force. *Mutat. Res.* 566:65-91.
- Brown, E. J. and D. Baltimore. 2003.** Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev.* 17:615-628.
- Brown, K. D., C. Barlow and A. Wynshaw-Boris. 1999.** Multiple ATM-dependent pathways: an explanation for pleiotropy. *Am. J. Hum. Genet.* 64:46-50.
- Buck, D., L. Malivert, R. de Chasseval, A. Barraud, M. C. Fondaneche, O. Sanal, A. Plebani, J. L. Stephan, M. Hufnagel, F. le Deist, A. Fischer, A. Durandy, J. P. de Villartay and P. Revy. 2006.** Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* 124:287-299.
- Bulavin, D. V., Y. Higashimoto, I. J. Popoff, W. A. Gaarde, V. Basrur, O. Potapova, E. Appella and A. J. Fornace, Jr. 2001.** Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature* 411:102-107.
- Bullock, W. O., J. M. Fernandez and J. M. Short. 1987.** *Biotechniques* 5(4):376-378.
- Burdak-Rothkamm, S., K. Rothkamm and K. M. Prise. 2008.** ATM acts downstream of ATR in the DNA damage response signaling of bystander cells. *Cancer Res.* 68:7059-7065.
- Burma, S., B. P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa and D. J. Chen. 2001.** ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* 276:42462-42467.
- Callegari, A. J. and T. J. Kelly. 2007.** Shedding light on the DNA damage checkpoint. *Cell Cycle* 6:660-666.

- Cann, K. L. and G. G. Hicks. 2006.** Absence of an immediate G1/S checkpoint in primary MEFs following gamma-irradiation identifies a novel checkpoint switch. *Cell Cycle* 5:1823-1830.
- Cardoso, M.C., C. Joseph, H.P. Rahn, R. Reusch, B. Nadal-Ginard and H. Leonhardt. 1997.** Mapping and use of a sequence that targets DNA ligase I to sites of DNA replication in vivo. *J. Cell Biol.*, 139, 579-587.
- Carnero, A. and G. J. Hannon. 1998.** The INK4 family of CDK inhibitors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 227:43-55.
- Celis, J. E. and A. Celis. 1985.** Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82:3262-3266.
- Celis, J. E. and P. Madsen. 1986.** Increased nuclear cyclin/PCNA antigen staining of non S-phase transformed human amnion cells engaged in nucleotide excision DNA repair. *FEBS Lett.* 209:277-283.
- Chang, D. K., L. Ricciardiello, A. Goel, C. L. Chang and C. R. Boland. 2000.** Steady-state regulation of the human DNA mismatch repair system. *J. Biol. Chem.* 275:18424-18431.
- Chehab, N. H., A. Malikzay, M. Appel and T. D. Halazonetis. 2000.** Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev.* 14:278-288.
- Chernov, M. V., C. V. Ramana, V. V. Adler and G. R. Stark. 1998.** Stabilization and activation of p53 are regulated independently by different phosphorylation events. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:2284-2289.
- Chung, C. T., S. L. Niemela and R. H. Miller, 1989.** One-Step Preparation of Competent Escherichia Coli: Transformation and Storage of Bacterial Cells in the Same Solution *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 2172-2175.
- Clauß, M., R. Mannesmann and A. Kolch. 2005.** Photoreactivation of Escherichia coli and Yersinia enterocolitica after Irradiation with a 222 nm Excimer Lamp Compared to a 254 nm Low-pressure Mercury Lamp. Published Online: 579-584.
- Cliby, W. A., C. J. Roberts, K. A. Cimprich, C. M. Stringer, J. R. Lamb, S. L. Schreiber and S. H. Friend. 1998.** Overexpression of a kinase-inactive ATR protein causes sensitivity to DNA-damaging agents and defects in cell cycle checkpoints. *EMBO J.* 17:159-169.
- Cobrinik, D. 1996.** Regulatory interactions among E2Fs and cell cycle control proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 208:31-61.
- Coin, F., V. Oksenyich and J. M. Egly. 2007.** Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. *Mol. Cell* 26:245-256.
- Collins, K., T. Jacks and N. P. Pavletich. 1997.** The cell cycle and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:2776-2778.
- Coltrera, M.D. and A.M. Gown. 1991.** PCNA/cyclin expression and BrdU uptake define different subpopulations in different cell lines. *J. Histochem. Cytochem.*, 39, 23-30.
- Coons, A. H. and M. H. Kaplan. 1950.** Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exp. Med.*, 91, 1-13.
- Cornforth, M. N. and J. S. Bedford. 1993.** Ionizing Radiation Damage and Its Early Development in Chromosomes. *Advances in Radiation Biology*, Vol.17, 423-489.
- Cortez, D., Y. Wang, J. Qin and S. J. Elledge. 1999.** Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* 286:1162-1166.
- Cortez, D., S. Guntuku, J. Qin and S. J. Elledge. 2001.** ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* 294:1713-1716.
- Costanzo, V., K. Robertson, C. Y. Ying, E. Kim, E. Avvedimento, M. Gottesman, D. Grieco and J. Gautier. 2000.** Reconstitution of an ATM-dependent checkpoint that inhibits chromosomal DNA replication following DNA damage. *Mol. Cell* 6:649-659.
- D'Errico, M., M. Teson, A. Calcagnile, D. S. Proietti, O. Nikaido, E. Botta, G. Zambruno, M. Stefanini and E. Dogliotti. 2003.** Apoptosis and efficient repair of DNA damage protect human keratinocytes against UVB. *Cell Death. Differ.* 10:754-756.
- Da Silva, L. F. and B. P. Duncker. 2007.** ORC function in late G1: maintaining the license for DNA replication. *Cell Cycle* 6:128-130.
- Dahm-Daphi, J., C. Sass and W. Alberti. 2000.** Comparison of biological effects of DNA damage induced by ionizing radiation and hydrogen peroxide in CHO cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 76:67-75.
- Dai, Y., B. Kysela, L. A. Hanakahi, K. Manolis, E. Riballo, M. Stumm, T. O. Harville, S. C. West, M. A. Oettinger and P. A. Jeggo. 2003.** Nonhomologous end joining and V(D)J recombination require an additional factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:2462-2467.

- Dash, B. C. and W. S. El Deiry. 2005.** Phosphorylation of p21 in G2/M promotes cyclin B-Cdc2 kinase activity. *Mol. Cell Biol.* 25:3364-3387.
- de Toledo, S. M., E. I. Azzam, W. K. Dahlberg, T. B. Gooding and J. B. Little. 2000.** ATM complexes with HDM2 and promotes its rapid phosphorylation in a p53-independent manner in normal and tumor human cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* 19:6185-6193.
- DeCaprio, J. A., Y. Furukawa, F. Ajchenbaum, J. D. Griffin and D. M. Livingston. 1992.** The retinoblastoma-susceptibility gene product becomes phosphorylated in multiple stages during cell cycle entry and progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:1795-1798.
- Deckbar, D., J. Birraux, A. Krempler, L. Tchouandong, A. Beucher, S. Walker, T. Stiff, P. Jeggo and M. Lobrich. 2007.** Chromosome breakage after G2 checkpoint release. *J. Cell Biol.* 176:749-755.
- Deckbar, D., T. Stiff, B. Koch, C. Reis, M. Lobrich and P. A. Jeggo. 2010.** The limitations of the G1-S checkpoint. *Cancer Res.* 70:4412-4421.
- Demple, B. and S. Linn. 1982.** 5,6-Saturated thymine lesions in DNA: production by ultraviolet light or hydrogen peroxide. *Nucleic Acids Res.* 10:3781-3789.
- Di Leonardo, A., S. P. Linke, K. Clarkin and G. M. Wahl. 1994.** DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 8:2540-2551.
- Dikomey, E. and J. Franzke. 1986.** DNA repair kinetics after exposure to X-irradiation and to internal beta-rays in CHO cells. *Radiat. Environ. Biophys.* 25:189-194.
- Doetsch, P. W., T. H. Zasatawny, A. M. Martin and M. Dizdaroglu. 1995.** Monomeric base damage products from adenine, guanine, and thymine induced by exposure of DNA to ultraviolet radiation. *Biochemistry* 34:737-742.
- Dore, A. S., M. L. Kilkenney, N. J. Rzechorzek and L. H. Pearl. 2009.** Crystal structure of the rad9-rad1-hus1 DNA damage checkpoint complex--implications for clamp loading and regulation. *Mol. Cell* 34:735-745.
- Douki, T. and J. Cadet. 2001.** Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions. *Biochemistry* 40:2495-2501.
- Drapkin, R., J. T. Reardon, A. Ansari, J. C. Huang, L. Zawel, K. Ahn, A. Sancar and D. Reinberg. 1994.** Dual role of TFIIF in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II. *Nature* 368:769-772.
- Dulic, V., G. H. Stein, D. F. Far and S. I. Reed. 1998.** Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition. *Mol. Cell Biol.* 18:546-557.
- Dyson, N. 1998.** The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12:2245-2262.
- Easwaran, H. P., H. Leonhardt and M. C. Cardoso. 2005.** Cell cycle markers for live cell analyses. *Cell Cycle* 4:453-455.
- Ehmann, U. K., K. H. Cook and E. C. Friedberg. 1978.** The kinetics of thymine dimer excision in ultraviolet-irradiated human cells. *Biophys. J.* 22:249-264.
- Falck, J., N. Mailand, R. G. Syljuasen, J. Bartek and J. Lukas. 2001.** The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*, 410, 842-847.
- Falck, J., J. H. Petrini, B. R. Williams, J. Lukas and J. Bartek. 2002.** The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat. Genet.* 30:290-294.
- Falck, J., J. Coates and S. P. Jackson. 2005.** Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434:605-611.
- Feng, Z., W. Hu, L. A. Chasin and M. S. Tang. 2003.** Effects of genomic context and chromatin structure on transcription-coupled and global genomic repair in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 31:5897-5906.
- Fernandez-Capetillo, O., H. T. Chen, A. Celeste, I. Ward, P. J. Romanienko, J. C. Morales, K. Naka, Z. Xia, R. D. Camerini-Otero, N. Motoyama, P. B. Carpenter, W. M. Bonner, J. Chen and A. Nussenzweig. 2002.** DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat. Cell Biol.* 4:993-997.
- Fohe, C. and E. Dikomey. 1994.** Induction and repair of DNA base damage studied in X-irradiated CHO cells using the M. luteus extract. *Int. J. Radiat. Biol.* 66:697-704.
- Fousteri, M. and L. H. Mullenders. 2008.** Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res.* 18:73-84.
- Franchitto, A., P. Pichierri, P. Mosesso and F. Palitti. 1998.** Caffeine effect on the mitotic delay induced by G2 treatment with UVC or mitomycin C. *Mutagenesis* 13:499-505.
- Friedberg, E. C., G. C. Walker and W. Siede. 1995.** DNA Repair and Mutagenesis. American Society for Microbiology Press, Washington, DC.

- Friedberg, E. C., A. Aguilera, M. Gellert, P. C. Hanawalt, J. B. Hays, A. R. Lehmann, T. Lindahl, N. Lowndes, A. Sarasin and R. D. Wood. 2006.** DNA repair: from molecular mechanism to human disease. *DNA Repair (Amst)*, 5, 986-996.
- Friedberg E. C., G. C. Walker, W. Siede, R. D. Wood, R. A. Schultz, T. Ellenberger. 2006.** DNA Repair and Mutagenesis, ASM Press, 2nd Edition
- Frigault, M. M., J. Lacoste, J. L. Swift and C. M. Brown. 2009.** Live-cell microscopy - tips and tools. *J. Cell Sci.* 122:753-767.
- Gadbois, D. M. and B. E. Lehnert. 1997.** Temporal position of G1 arrest in normal human fibroblasts after exposure to gamma-rays. *Exp. Cell Res.* 232:161-166.
- Gary, R., D. L. Ludwig, H. L. Cornelius, M. A. MacInnes and M. S. Park. 1997.** The DNA repair endonuclease XPG binds to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and shares sequence elements with the PCNA-binding regions of FEN-1 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *J. Biol. Chem.*, 272, 24522-24529.
- Gatei, M., K. Sloper, C. Sorensen, R. Syljuasen, J. Falck, K. Hobson, K. Savage, J. Lukas, B. B. Zhou, J. Bartek and K. K. Khanna. 2003.** Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J. Biol. Chem.* 278:14806-14811.
- Gatti, R. A., I. Berkel, E. Boder, G. Braedt, P. Charmley, P. Concannon, F. Ersoy, T. Foroud, N. G. Jaspers and K. Lange. 1988.** Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature*, 336, 577-580.
- Gellert, M., J. E. Hesse, K. Hiom, M. Melek, M. Modesti, T. T. Paull, D. A. Ramsden and D. C. van Gent. 1999.** V(D)J recombination: links to transposition and double-strand break repair. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 64:161-167.
- Gellert, M. 2002.** V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 71:101-132.
- Gerber, B., P. Mathys, M. Moser, D. Bressoud and C. Braun-Fahrlander. 2002.** Ultraviolet emission spectra of sunbeds. *Photochem. Photobiol.* 76:664-668.
- Giannattasio, M., F. Lazzaro, M. P. Longhese, P. Plevani and M. Muzi-Falconi. 2004.** Physical and functional interactions between nucleotide excision repair and DNA damage checkpoint. *EMBO J.* 23:429-438.
- Gilbert, D. M. 2001.** Making sense of eukaryotic DNA replication origins. *Science* 294:96-100.
- Gillet, L. C. and O. D. Scharer. 2006.** Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem. Rev.* 106:253-276.
- Girard, F., U. Strausfeld, A. Fernandez and N. J. Lamb. 1991.** Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 67:1169-1179.
- Goetz, J. D., T. A. Motycka, M. Han, M. Jasin and A. E. Tomkinson. 2005.** Reduced repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination in a DNA ligase I-deficient human cell line. *DNA Repair (Amst)*, 4, 649-654.
- Goldberg, M., M. Stucki, J. Falck, D. D'Amours, D. Rahman, D. Pappin, J. Bartek and S. P. Jackson. 2003.** MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. *Nature* 421:952-956.
- Goodship, J., H. Gill, J. Carter, A. Jackson, M. Splitt and M. Wright. 2000.** Autozygosity mapping of a seckel syndrome locus to chromosome 3q22.1-q24. *Am. J. Hum. Genet.* 67:498-503.
- Gorisch, S. M., A. Sporbert, J. H. Stear, I. Grunewald, D. Nowak, E. Warbrick, H. Leonhardt and M. C. Cardoso. 2008.** Uncoupling the replication machinery: replication fork progression in the absence of processive DNA synthesis. *Cell Cycle* 7:1983-1990.
- Gradia, S., S. Acharya and R. Fishel. 1997.** The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch. *Cell* 91:995-1005.
- Grallert, B. and E. Boye. 2008.** The multiple facets of the intra-S checkpoint. *Cell Cycle* 7:2315-2320.
- Greener, A. 1990.** *Strategies* 3(1):5-6
- Griffiths, T. D. and S. Y. Ling. 1989.** Effects of UV light on DNA chain growth and replicon initiation in human cells. *Mutat. Res.* 218:87-94.
- Grimes, B. R., J. Babcock, M. K. Rudd, B. Chadwick and H. F. Willard. 2004.** Assembly and characterization of heterochromatin and euchromatin on human artificial chromosomes. *Genome Biol.* 5:R89.
- Gu, W. and R. G. Roeder. 1997.** Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90:595-606.
- Gutierrez, G. J., T. Tsuji, J. V. Cross, R. J. Davis, D. J. Templeton, W. Jiang and Z. A. Ronai. 2010.** JNK-mediated phosphorylation of Cdc25C regulates cell cycle entry and G2/M DNA damage checkpoint. *J. Biol. Chem.*
- Halicka, H. D., X. Huang, F. Traganos, M. A. King, W. Dai and Z. Darzynkiewicz. 2005.** Histone H2AX phosphorylation after cell irradiation with UV-B: relationship to cell cycle phase and induction of apoptosis. *Cell Cycle* 4:339-345.

- Hall, E. J. and A. J. Giaccia. 2006.** Radiobiology for the Radiologist. 6. Auflage
- Hall, A. G. and M. J. Tilby. 1992.** Mechanisms of action of, and modes of resistance to, alkylating agents used in the treatment of haematological malignancies. *Blood Rev.* 6:163-173.
- Hanahan, D. 1983.** Studies on transformation of E.coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580
- Hanasoge, S. and M. Ljungman. 2007.** H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis* 28:2298-2304.
- Hannan, M. A., A. Hellani, F. M. Al Khodairy, M. Kunhi, Y. Siddiqui, N. Al Yussef, N. Pangué-Cruz, M. Siewertsén, M. N. Al Ahdal and A. Aboussekhra. 2002.** Deficiency in the repair of UV-induced DNA damage in human skin fibroblasts compromised for the ATM gene. *Carcinogenesis* 23:1617-1624.
- Hans, F. and S. Dimitrov. 2001.** Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene* 20:3021-3027.
- Harrington, E. A., J. L. Bruce, E. Harlow and N. Dyson. 1998.** pRB plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:11945-11950.
- Hartwell, L. H. and T. A. Weinert. 1989.** Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246:629-634.
- Heffernan, T. P., D. A. Simpson, A. R. Frank, A. N. Heinloth, R. S. Paules, M. Cordeiro-Stone and W. K. Kaufmann. 2002.** An ATR- and Chk1-dependent S checkpoint inhibits replicon initiation following UVC-induced DNA damage. *Mol. Cell Biol.* 22:8552-8561.
- Helin, K. 1998.** Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8:28-35.
- Helleday, T., J. Lo, D. C. van Gent and B. P. Engelward. 2007.** DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)* 6:923-935.
- Helt, C. E., W. A. Cliby, P. C. Keng, R. A. Bambara and M. A. O'Reilly. 2005.** Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and Rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage. *J. Biol. Chem.* 280:1186-1192.
- Henderson, L., H. Cole, C. Arlett, S. E. James, J. Cole, A. Lehmann, L. Rosenbloom, T. Redmond and S. Meller. 1985.** Diagnosis of ataxia-telangiectasia by T-lymphocyte cloning assay. *Lancet* 2:1242.
- Hengst, L. and S. I. Reed. 1998.** Inhibitors of the Cip/Kip family. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 227:25-41.
- Hermeking, H., C. Lengauer, K. Polyak, T. C. He, L. Zhang, S. Thiagalingam, K. W. Kinzler and B. Vogelstein. 1997.** 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol. Cell* 1:3-11.
- Herrmann T., M. Baumann, W. Dörr. 2006.** Klinische Strahlenbiologie, Urban und Fischer Verlag, 4.Auflage
- Hess, M.T., D. Gunz, N. Luneva, N.E. Geacintov and H. Naegeli. 1997.** Base pair conformation-dependent excision of benzo[a]pyrene diol epoxide-guanine adducts by human nucleotide excision repair enzymes. *Mol. Cell Biol.*, 17, 7069-7076.
- Hockberger, P. E. 2002.** A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms. *Photochem. Photobiol.* 76:561-579.
- Hoeijmakers, J. H. 1994.** Human nucleotide excision repair syndromes: molecular clues to unexpected intricacies. *Eur. J. Cancer* 30A:1912-1921.
- Hoeijmakers, J. H. 2001.** Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366-374.
- Hoffmann, I., G. Draetta and E. Karsenti. 1994.** Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *EMBO J.* 13:4302-4310.
- Hollander, M. C., M. S. Sheikh, D. V. Bulavin, K. Lundgren, L. Augeri-Henmueller, R. Shehee, T. A. Molinaro, K. E. Kim, E. Tolosa, J. D. Ashwell, M. P. Rosenberg, Q. Zhan, P. M. Fernandez-Salguero, W. F. Morgan, C. X. Deng and A. J. Fornace, Jr. 1999.** Genomic instability in Gadd45a-deficient mice. *Nat. Genet.* 23:176-184.
- Hollick, J. J., B. T. Golding, I. R. Hardcastle, N. Martin, C. Richardson, L. J. Rigoreau, G. C. Smith and R. J. Griffin. 2003.** 2,6-disubstituted pyran-4-one and thiopyran-4-one inhibitors of DNA-Dependent protein kinase (DNA-PK). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13:3083-3086.
- Hozak, P., A. B. Hassan, D. A. Jackson and P. R. Cook. 1993.** Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton. *Cell*, 73, 361-373.
- Huang, L. C., K. C. Clarkin and G. M. Wahl. 1996.** Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G1 arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:4827-4832.

- Huang, X., M. A. King, H. D. Halicka, F. Traganos, M. Okafuji and Z. Darzynkiewicz. 2004.** Histone H2AX phosphorylation induced by selective photolysis of BrdU-labeled DNA with UV light: relation to cell cycle phase. *Cytometry A* 62:1-7.
- Iliakis, G., Y. Wang, J. Guan and H. Wang. 2003.** DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* 22:5834-5847.
- Ivanov, I., B. R. Chapados, J. A. McCammon and J. A. Tainer. 2006.** Proliferating cell nuclear antigen loaded onto double-stranded DNA: dynamics, minor groove interactions and functional implications. *Nucleic Acids Res.* 34:6023-6033.
- Iwamoto, K., Y. Tashima, H. Hamada, Y. Eguchi and M. Okamoto. 2008.** Mathematical modeling and sensitivity analysis of G1/S phase in the cell cycle including the DNA-damage signal transduction pathway. *Biosystems* 94:109-117.
- Jackman, M., Y. Kubota, N. den Elzen, A. Hagting and J. Pines. 2002.** Cyclin A- and cyclin E-Cdk complexes shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *Mol. Biol. Cell* 13:1030-1045.
- Jain, S., M. I. Filipe, P. A. Hall, N. Waseem, D. P. Lane and D. A. Levison. 1991.** Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 44:655-659.
- Jascur, T. and C. R. Boland. 2006.** Structure and function of the components of the human DNA mismatch repair system. *Int. J. Cancer* 119:2030-2035.
- Jeggo, P. A. 1998.** DNA breakage and repair. *Adv. Genet.* 38:185-218.
- Jiang, G. and A. Sancar. 2006.** Recruitment of DNA damage checkpoint proteins to damage in transcribed and nontranscribed sequences. *Mol. Cell Biol.* 26:39-49.
- Jinno, S., K. Suto, A. Nagata, M. Igarashi, Y. Kanaoka, H. Nojima and H. Okayama. 1994.** Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *EMBO J.* 13:1549-1556.
- Jonsson, Z. O. and U. Hubscher. 1997.** Proliferating cell nuclear antigen: more than a clamp for DNA polymerases. *Bioessays* 19:967-975.
- Kastan, M. B., O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein and R. W. Craig. 1991.** Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 51:6304-6311.
- Kastan, M. B., Q. Zhan, W. S. El Deiry, F. Carrier, T. Jacks, W. V. Walsh, B. S. Plunkett, B. Vogelstein and A. J. Fornace, Jr. 1992.** A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71:587-597.
- Kastan, M. B. and D. S. Lim. 2000.** The many substrates and functions of ATM. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1, 179-186.
- Kaufmann, W. K. and J. E. Cleaver. 1981.** Mechanisms of inhibition of DNA replication by ultraviolet light in normal human and xeroderma pigmentosum fibroblasts. *J. Mol. Biol.* 149:171-187.
- Kaufmann, W. K. and S. J. Wilson. 1994.** G1 arrest and cell-cycle-dependent clastogenesis in UV-irradiated human fibroblasts. *Mutat. Res.* 314:67-76.
- Kaufmann, W. K., T. P. Heffernan, L. M. Beaulieu, S. Doherty, A. R. Frank, Y. Zhou, M. F. Bryant, T. Zhou, D. D. Luche, N. Nikolaishvili-Feinberg, D. A. Simpson and M. Cordeiro-Stone. 2003.** Caffeine and human DNA metabolism: the magic and the mystery. *Mutat. Res.* 532:85-102.
- Kegel, P., E. Riballo, M. Kuhne, P. A. Jeggo and M. Lobrich. 2007.** X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact. *DNA Repair (Amst)* 6:1692-1697.
- Kelman, Z. and M. O'Donnell. 1995.** Structural and functional similarities of prokaryotic and eukaryotic DNA polymerase sliding clamps. *Nucleic Acids Res.* 23:3613-3620.
- Kelman, Z. 1997.** PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* 14:629-640.
- Khanna, K. K. and M. F. Lavin. 1993.** Ionizing radiation and UV induction of p53 protein by different pathways in ataxia-telangiectasia cells. *Oncogene* 8:3307-3312.
- Khanna, K. K. and S. P. Jackson. 2001.** DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.* 27:247-254.
- Kiefer J., I. Kiefer. 2003.** Allgemeine Radiologie. Parey Buchverlag 1. Auflage
- Kim, S. T., K. Malhotra, C. A. Smith, J. S. Taylor and A. Sancar. 1994.** Characterization of (6-4) photoproduct DNA photolyase. *J. Biol. Chem.* 269:8535-8540.
- Kinner, A., W. Wu, C. Staudt and G. Iliakis. 2008.** Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* 36:5678-5694.
- Koch, C. A., R. Agyei, S. Galicia, P. Metalnikov, P. O'Donnell, A. Starostine, M. Weinfeld and D. Durocher. 2004.** Xrcc4 physically links DNA end processing by polynucleotide kinase to DNA ligation by DNA ligase IV. *EMBO J.* 23:3874-3885.

- Koff, A., A. Giordano, D. Desai, K. Yamashita, J. W. Harper, S. Elledge, T. Nishimoto, D. O. Morgan, B. R. Franza and J. M. Roberts. 1992.** Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 257:1689-1694.
- Krishna, T. S., X. P. Kong, S. Gary, P. M. Burgers and J. Kuriyan. 1994.** Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell* 79:1233-1243.
- Kuerbitz, S. J., B. S. Plunkett, W. V. Walsh and M. B. Kastan. 1992.** Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:7491-7495.
- Kuzminov, A. 2001.** DNA replication meets genetic exchange: chromosomal damage and its repair by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:8461-8468.
- Lambert, S. and A. M. Carr. 2005.** Checkpoint responses to replication fork barriers. *Biochimie* 87:591-602.
- Landers, J. E., S. L. Cassel and D. L. George. 1997.** Translational enhancement of mdm2 oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein. *Cancer Res.* 57:3562-3568.
- Lange, S., T. Viergutz and M. Simko. 2004.** Modifications in cell cycle kinetics and in expression of G1 phase-regulating proteins in human amniotic cells after exposure to electromagnetic fields and ionizing radiation. *Cell Prolif.* 37:337-349.
- Lavin, M. F. and Y. Shiloh. 1997.** The genetic defect in ataxia-telangiectasia. *Annu. Rev. Immunol.* 15:177-202.
- Lavin, M. F. 2004.** The Mre11 complex and ATM: a two-way functional interaction in recognising and signaling DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 3:1515-1520.
- Lempiainen, H. and T. D. Halazonetis. 2009.** Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks. *EMBO J.*, 28, 3067-3073.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler and B. Vogelstein. 1998.** Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396:643-649.
- Leonhardt, H., H. P. Rahn, P. Weinzierl, A. Sporberr, T. Cremer, D. Zink and M. C. Cardoso. 2000.** Dynamics of DNA replication factories in living cells. *J. Cell Biol.* 149:271-280.
- Levine, A. J., Z. Feng, T. W. Mak, H. You and S. Jin. 2006.** Coordination and communication between the p53 and IGF-1-AKT-TOR signal transduction pathways. *Genes Dev.* 20:267-275.
- Li, J., T. Uchida, T. Todo and T. Kitagawa. 2006.** Similarities and differences between cyclobutane pyrimidine dimer photolyase and (6-4) photolyase as revealed by resonance Raman spectroscopy: Electron transfer from the FAD cofactor to ultraviolet-damaged DNA. *J. Biol. Chem.* 281:25551-25559.
- Liebermann, D. A. and B. Hoffman. 2008.** Gadd45 in stress signaling. *J. Mol. Signal.* 3:15.
- Limoli, C. L., E. Giedzinski, W. M. Bonner and J. E. Cleaver. 2002.** UV-induced replication arrest in the xeroderma pigmentosum variant leads to DNA double-strand breaks, gamma -H2AX formation, and Mre11 relocalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:233-238.
- Lindahl, T. and Nyberg, B. 1974.** Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 13, 3405-3410.
- Linke, S. P., K. C. Clarkin and G. M. Wahl. 1997.** p53 mediates permanent arrest over multiple cell cycles in response to gamma-irradiation. *Cancer Res.* 57:1171-1179.
- Lippincott-Schwartz, J. and G. H. Patterson. 2003.** Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* 300:87-91.
- Little, J. B. 1968.** Delayed initiation of DNA synthesis in irradiated human diploid cells. *Nature* 218:1064-1065.
- Ljungman, M. and F. Zhang. 1996.** Blockage of RNA polymerase as a possible trigger for u.v. light-induced apoptosis. *Oncogene* 13:823-831.
- Ljungman, M., F. Zhang, F. Chen, A. J. Rainbow and B. C. McKay. 1999.** Inhibition of RNA polymerase II as a trigger for the p53 response. *Oncogene* 18:583-592.
- Lobrich, M., S. Ipkeme, P. Haub, K. J. Weber and J. Kiefer. 1993.** DNA double-strand break induction in yeast by X-rays and alpha-particles measured by pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Radiat. Biol.*, 64, 539-546.
- Lobrich, M., B. Rydberg and P. K. Cooper. 1995.** Repair of x-ray-induced DNA double-strand breaks in specific Not I restriction fragments in human fibroblasts: joining of correct and incorrect ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:12050-12054.
- Lobrich, M. and P. A. Jeggo. 2007.** The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat. Rev. Cancer* 7:861-869.

- Loffler, H., T. Bochtler, B. Fritz, B. Tews, A. D. Ho, J. Lukas, J. Bartek and A. Kramer. 2007.** DNA damage-induced accumulation of centrosomal Chk1 contributes to its checkpoint function. *Cell Cycle* 6:2541-2548.
- Loignon, M. and E. A. Drobetsky. 2002.** The initiation of UV-induced G(1) arrest in human cells is independent of the p53/p21/pRb pathway but can be attenuated through expression of the HPV E7 oncoprotein. *Carcinogenesis* 23:35-45.
- Lou, Z., K. Minter-Dykhouse, S. Franco, M. Gostissa, M. A. Rivera, A. Celeste, J. P. Manis, J. van Deursen, A. Nussenzweig, T. T. Paull, F. W. Alt and J. Chen. 2006.** MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol. Cell* 21:187-200.
- Lu, H., Y. Taya, M. Ikeda and A. J. Levine. 1998.** Ultraviolet radiation, but not gamma radiation or etoposide-induced DNA damage, results in the phosphorylation of the murine p53 protein at serine-389. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:6399-6402.
- Lu, X. and D. P. Lane. 1993.** Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes? *Cell* 75:765-778.
- Lukas, C., F. Melander, M. Stucki, J. Falck, S. Bekker-Jensen, M. Goldberg, Y. Lerenthal, S. P. Jackson, J. Bartek and J. Lukas. 2004.** Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *EMBO J.* 23:2674-2683.
- Lukas, J., C. Lukas and J. Bartek. 2004.** Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* 3:997-1007.
- Lundberg, A. S. and R. A. Weinberg. 1999.** Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur. J. Cancer*, 35, 531-539.
- Lundin, C., K. Erixon, C. Arnaudeau, N. Schultz, D. Jenssen, M. Meuth and T. Helleday. 2002.** Different roles for nonhomologous end joining and homologous recombination following replication arrest in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.*, 22, 5869-5878.
- Ma, Y., U. Pannicke, K. Schwarz and M. R. Lieber. 2002.** Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108:781-794.
- Ma, Y., H. Lu, K. Schwarz and M. R. Lieber. 2005.** Repair of double-strand DNA breaks by the human nonhomologous DNA end joining pathway: the iterative processing model. *Cell Cycle* 4:1193-1200.
- Mackenney, V. J., D. E. Barnes and T. Lindahl. 1997.** Specific function of DNA ligase I in simian virus 40 DNA replication by human cell-free extracts is mediated by the amino-terminal non-catalytic domain. *J. Biol. Chem.*, 272, 11550-11556.
- Macurek, L., A. Lindqvist, O. Voets, J. Kool, H. R. Vos and R. H. Medema. 2010.** Wip1 phosphatase is associated with chromatin and dephosphorylates gammaH2AX to promote checkpoint inhibition. *Oncogene* 29:2281-2291.
- Maga, G. and U. Hubscher. 2003.** Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J. Cell Sci.* 116:3051-3060.
- Mahrhofer, H., S. Burger, U. Oppitz, M. Flentje and C. S. Djuzenova. 2006.** Radiation induced DNA damage and damage repair in human tumor and fibroblast cell lines assessed by histone H2AX phosphorylation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 64:573-580.
- Mailand, N., S. Bekker-Jensen, H. Fastrup, F. Melander, J. Bartek, C. Lukas and J. Lukas. 2007.** RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell*, 131, 887-900.
- Majka, J., A. Niedziela-Majka and P. M. Burgers. 2006.** The checkpoint clamp activates Mec1 kinase during initiation of the DNA damage checkpoint. *Mol. Cell* 24:891-901.
- Maki, C. G. and P. M. Howley. 1997.** Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Mol. Cell Biol.* 17:355-363.
- Mannironi, C., W. M. Bonner and C. L. Hatch. 1989.** H2A.X, a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals. *Nucleic Acids Res.* 17:9113-9126.
- Marini, F., T. Nardo, M. Giannattasio, M. Minuzzo, M. Stefanini, P. Plevani and F. M. Muzi. 2006.** DNA nucleotide excision repair-dependent signaling to checkpoint activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:17325-17330.
- Marti, T. M., E. Hefner, L. Feeney, V. Natale and J. E. Cleaver. 2006.** H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:9891-9896.
- Matsumoto, M., K. Yaginuma, A. Igarashi, M. Imura, M. Hasegawa, K. Iwabuchi, T. Date, T. Mori, K. Ishizaki, K. Yamashita, M. Inobe and T. Matsunaga. 2007.** Perturbed gap-filling synthesis in nucleotide excision repair causes histone H2AX phosphorylation in human quiescent cells. *J. Cell Sci.* 120:1104-1112.

- Matsumoto, Y. and K. Kim. 1995.** Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science* 269:699-702.
- Matsuoka, S., M. Huang and S. J. Elledge. 1998.** Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science*, 282, 1893-1897.
- Matsuoka, S., B. A. Ballif, A. Smogorzewska, E. R. McDonald, III, K. E. Hurov, J. Luo, C. E. Bakalarski, Z. Zhao, N. Solimini, Y. Lerenthal, Y. Shiloh, S. P. Gygi and S. J. Elledge. 2007.** ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316:1160-1166.
- McIlwraith, M. J., A. Vaisman, Y. Liu, E. Fanning, R. Woodgate and S. C. West. 2005.** Human DNA polymerase eta promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination. *Mol. Cell* 20:783-792.
- Medrano, E. E., S. Im, F. Yang and Z. A. Abdel-Malek. 1995.** Ultraviolet B light induces G1 arrest in human melanocytes by prolonged inhibition of retinoblastoma protein phosphorylation associated with long-term expression of the p21Waf-1/SDI-1/Cip-1 protein. *Cancer Res.* 55:4047-4052.
- Meister, P., A. Taddei, A. Ponti, G. Baldacci and S. M. Gasser. 2007.** Replication foci dynamics: replication patterns are modulated by S-phase checkpoint kinases in fission yeast. *EMBO J.* 26:1315-1326.
- Melixetian, M., D. K. Klein, C. S. Sorensen and K. Helin. 2009.** NEK11 regulates CDC25A degradation and the IR-induced G2/M checkpoint. *Nat. Cell Biol.* 11:1247-1253.
- Mellon, I., G. Spivak and P. C. Hanawalt. 1987.** Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell* 51:241-249.
- Mihara, K., X. R. Cao, A. Yen, S. Chandler, B. Driscoll, A. L. Murphree, A. T'Ang and Y. K. Fung. 1989.** Cell cycle-dependent regulation of phosphorylation of the human retinoblastoma gene product. *Science* 246:1300-1303.
- Mitchell, D. L., C. A. Haipek and J. M. Clarkson. 1985.** (6-4)Photoproducts are removed from the DNA of UV-irradiated mammalian cells more efficiently than cyclobutane pyrimidine dimers. *Mutat. Res.* 143:109-112.
- Mitchell, D. L., J. Jen and J. E. Cleaver. 1991.** Relative induction of cyclobutane dimers and cytosine photohydrates in DNA irradiated in vitro and in vivo with ultraviolet-C and ultraviolet-B light. *Photochem. Photobiol.* 54:741-746.
- Mittnacht, S. 1998.** Control of pRB phosphorylation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8:21-27.
- Modrich, P. 1991.** Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu. Rev. Genet.* 25:229-253.
- Montecucco, A., E. Savini, F. Weighardt, R. Rossi, G. Ciarrocchi, A. Villa and G. Biamonti. 1995.** The N-terminal domain of human DNA ligase I contains the nuclear localization signal and directs the enzyme to sites of DNA replication. *EMBO J.*, 14, 5379-5386.
- Mortusewicz, O., U. Rothbauer, M. C. Cardoso and H. Leonhardt. 2006.** Differential recruitment of DNA Ligase I and III to DNA repair sites. *Nucleic Acids Res.* 34:3523-3532.
- Moser, J., M. Volker, H. Kool, S. Alekseev, H. Vrieling, A. Yasui, A. A. van Zeeland and L. H. Mullenders. 2005.** The UV-damaged DNA binding protein mediates efficient targeting of the nucleotide excision repair complex to UV-induced photo lesions. *DNA Repair (Amst)* 4:571-582.
- Moser, J., H. Kool, I. Giakzidis, K. Caldecott, L. H. Mullenders and M. I. Foustieri. 2007.** Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner. *Mol. Cell* 27:311-323.
- Mozumder, A. and J. L. Magee. 1966.** A simplified approach to diffusion-controlled radical reactions in the tracks of ionizing radiations. *Radiat. Res.* 28:215-231.
- Mu, D., C. H. Park, T. Matsunaga, D. S. Hsu, J. T. Reardon and A. Sancar. 1995.** Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system. *J. Biol. Chem.* 270:2415-2418.
- Mullenders, L., M. Atkinson, H. Paretzke, L. Sabatier and S. Bouffler. 2009.** Assessing cancer risks of low-dose radiation. *Nat. Rev. Cancer* 9:596-604.
- Mullenders, L. H., H. Vrieling, J. Venema and A. A. van Zeeland. 1991.** Hierarchies of DNA repair in mammalian cells: biological consequences. *Mutat. Res.* 250:223-228.
- Myung, K., A. Datta and R. D. Kolodner. 2001.** Suppression of spontaneous chromosomal rearrangements by S phase checkpoint functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 104:397-408.
- Myung, K., C. Chen and R. D. Kolodner. 2001.** Multiple pathways cooperate in the suppression of genome instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 411:1073-1076.
- Nagasawa, H. and J. B. Little. 1983.** Comparison of kinetics of X-ray-induced cell killing in normal, ataxia telangiectasia and hereditary retinoblastoma fibroblasts. *Mutat. Res.* 109:297-308.

- Nagasawa, H., P. Keng, C. Maki, Y. Yu and J. B. Little. 1998.** Absence of a radiation-induced first-cycle G1-S arrest in p53+ human tumor cells synchronized by mitotic selection. *Cancer Res.* 58:2036-2041.
- Nakamura, T. M., L. L. Du, C. Redon and P. Russell. 2004.** Histone H2A phosphorylation controls Crb2 recruitment at DNA breaks, maintains checkpoint arrest, and influences DNA repair in fission yeast. *Mol. Cell Biol.* 24:6215-6230.
- Nakamura, A. J., V.A. Rao, Y. Pommier and W.M. Bonner. 2010.** The complexity of phosphorylated H2AX-Foci formation and DNA repair assembly at DNA double-strand breaks. *Cell Cycle*, 9, 389-397.
- Neale, M. J. and S. Keeney. 2006.** Clarifying the mechanics of DNA strand exchange in meiotic recombination. *Nature* 442:153-158.
- Nghiem, P., P. K. Park, Y. Kim, C. Vaziri and S. L. Schreiber. 2001.** ATR inhibition selectively sensitizes G1 checkpoint-deficient cells to lethal premature chromatin condensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:9092-9097.
- Nick McElhinny, S. A., C. M. Snowden, J. McCarville and D. A. Ramsden. 2000.** Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol. Cell Biol.* 20:2996-3003.
- Nick McElhinny, S. A., J. M. Havener, M. Garcia-Diaz, R. Juarez, K. Bebenek, B. L. Kee, L. Blanco, T. A. Kunkel and D. A. Ramsden. 2005.** A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Mol. Cell* 19:357-366.
- Nikolova, T., M. Enslinger, M. Lobrich and B. Kaina. 2010.** Homologous recombination protects mammalian cells from replication-associated DNA double-strand breaks arising in response to methyl methanesulfonate. *DNA Repair (Amst).*
- Norval, M. 2006.** The mechanisms and consequences of ultraviolet-induced immunosuppression. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 92:108-118.
- O'Donovan, A., A. A. Davies, J. G. Moggs, S. C. West and R. D. Wood. 1994.** XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair. *Nature* 371:432-435.
- O'Driscoll, M., V. L. Ruiz-Perez, C. G. Woods, P. A. Jeggo and J. A. Goodship. 2003.** A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat. Genet.* 33:497-501.
- Oakley, G. G., L. I. Loberg, J. Yao, M. A. Risinger, R. L. Yunker, M. Zernik-Kobak, K. K. Khanna, M. F. Lavin, M. P. Carty and K. Dixon. 2001.** UV-induced hyperphosphorylation of replication protein a depends on DNA replication and expression of ATM protein. *Mol. Biol. Cell* 12:1199-1213.
- Obaya, A. J. and J. M. Sedivy. 2002.** Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell Mol. Life Sci.* 59:126-142.
- Obe, G., C. Johannes and D. Schulte-Frohlinde. 1992.** DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. *Mutagenesis* 7:3-12.
- Odersky, A., I. V. Panyutin, I. G. Panyutin, C. Schunck, E. Feldmann, W. Goedecke, R. D. Neumann, G. Obe and P. Pfeiffer. 2002.** Repair of sequence-specific 125I-induced double-strand breaks by nonhomologous DNA end joining in mammalian cell-free extracts. *J. Biol. Chem.* 277:11756-11764.
- Olive, P. L., D. Wlodek and J. P. Banath. 1991.** DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res.* 51:4671-4676.
- Orren, D. K., L. N. Petersen and V. A. Bohr. 1995.** A UV-responsive G2 checkpoint in rodent cells. *Mol. Cell Biol.* 15:3722-3730.
- Painter, R. B. and B. R. Young. 1980.** Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: a new explanation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77:7315-7317.
- Painter, R. B. 1985.** Inhibition and recovery of DNA synthesis in human cells after exposure to ultraviolet light. *Mutat. Res.* 145:63-69.
- Pandita, T. K., H. B. Lieberman, D. S. Lim, S. Dhar, W. Zheng, Y. Taya and M. B. Kastan. 2000.** Ionizing radiation activates the ATM kinase throughout the cell cycle. *Oncogene* 19:1386-1391.
- Pardee, A. B. 1974.** A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 71:1286-1290.
- Pascal, J. M., P. J. O'Brien, A. E. Tomkinson and T. Ellenberger. 2004.** Human DNA ligase I completely encircles and partially unwinds nicked DNA. *Nature* 432:473-478.
- Pattison, D. I. and M. J. Davies. 2006.** Actions of ultraviolet light on cellular structures. *EXS*131-157.
- Paull, T. T., E. P. Rogakou, V. Yamazaki, C. U. Kirchgessner, M. Gellert and W. M. Bonner. 2000.** A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.* 10:886-895.

- Peak, M. J., J. G. Peak and B. A. Carnes. 1987.** Induction of direct and indirect single-strand breaks in human cell DNA by far- and near-ultraviolet radiations: action spectrum and mechanisms. *Photochem. Photobiol.* 45:381-387.
- Pellegata, N. S., R. J. Antoniono, J. L. Redpath and E. J. Stanbridge. 1996.** DNA damage and p53-mediated cell cycle arrest: a reevaluation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:15209-15214.
- Pellegrini, L., D. S. Yu, T. Lo, S. Anand, M. Lee, T. L. Blundell and A. R. Venkitaraman. 2002.** Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* 420:287-293.
- Peltomaki, P. 2003.** Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J. Clin. Oncol.* 21:1174-1179.
- Petermann, E. and T. Helleday. 2007.** DNA replication-associated lesions: importance in early tumorigenesis and cancer therapy. *Biochem. Soc. Trans.* 35:1352-1354.
- Peters, J. M. 1999.** Subunits and substrates of the anaphase-promoting complex. *Exp. Cell Res.* 248:339-349.
- Popowski, M., H. A. Ferguson, A. M. Sion, E. Koller, E. Knudsen and C. L. Van Den Berg. 2008.** Stress and IGF-I differentially control cell fate through mammalian target of rapamycin (mTOR) and retinoblastoma protein (pRB). *J. Biol. Chem.* 283:28265-28273.
- Porter, L. A. and D. J. Donoghue. 2003.** Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators. *Prog. Cell Cycle Res.* 5:335-347.
- Prasher, D. C., V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast and M. J. Cormier. 1992.** Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111:229-233.
- Prosperi, E., L. A. Stivala, E. Sala, A. I. Scovassi and L. Bianchi. 1993.** Proliferating cell nuclear antigen complex formation induced by ultraviolet irradiation in human quiescent fibroblasts as detected by immunostaining and flow cytometry. *Exp. Cell Res.* 205:320-325.
- Prosperi, E. 2006.** The fellowship of the rings: distinct pools of proliferating cell nuclear antigen trimer at work. *FASEB J.* 20:833-837.
- Puck, T. T. and P. I. Marcus. 1956.** Action of x-rays on mammalian cells. *J. Exp. Med.* 103:653-666.
- Rappold, I., K. Iwabuchi, T. Date and J. Chen. 2001.** Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways. *J. Cell Biol.* 153:613-620.
- Reddy, Y. V., Q. Ding, S. P. Lees-Miller, K. Meek and D. A. Ramsden. 2004.** Non-homologous end joining requires that the DNA-PK complex undergo an autophosphorylation-dependent rearrangement at DNA ends. *J. Biol. Chem.* 279:39408-39413.
- Reitsema, T. J., J. P. Banath, S. H. MacPhail and P. L. Olive. 2004.** Hypertonic saline enhances expression of phosphorylated histone H2AX after irradiation. *Radiat. Res.* 161:402-408.
- Robertson, A. B., A. Klungland, T. Rognes and I. Leiros. 2009.** DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol. Life Sci.*, 66, 981-993.
- Rogakou, E. P., D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova and W. M. Bonner. 1998.** DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273:5858-5868.
- Rogakou, E. P. and K. E. Sekeri-Pataryas. 1999.** Histone variants of H2A and H3 families are regulated during in vitro aging in the same manner as during differentiation. *Exp. Gerontol.* 34:741-754.
- Rothkamm, K., M. Kuhne, P. A. Jeggo and M. Lobrich. 2001.** Radiation-induced genomic rearrangements formed by non-homologous end-joining of DNA double-strand breaks. *Cancer Res.* 61:3886-3893.
- Rothkamm, K. and M. Lobrich. 2003.** Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:5057-5062.
- Rothkamm, K., I. Kruger, L. H. Thompson and M. Lobrich. 2003.** Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol. Cell Biol.* 23:5706-5715.
- Rottach, A., E. Kremmer, D. Nowak, P. Boisguerin, R. Volkmer, M. C. Cardoso, H. Leonhardt, and U. Rothbauer. 2008.** Generation and characterization of a rat monoclonal antibody specific for PCNA. *Hybridoma (Larchmt.)* 27:91-98.
- Roza, L., W. Vermeulen, J. B. Bergen Henegouwen, A. P. Eker, N. G. Jaspers, P. H. Lohman and J. H. Hoeijmakers. 1990.** Effects of microinjected photoreactivating enzyme on thymine dimer removal and DNA repair synthesis in normal human and xeroderma pigmentosum fibroblasts. *Cancer Res.* 50:1905-1910.
- Ruiz de Almodovar, J. M., G. G. Steel, S. J. Whitaker and T. J. McMillan. 1994.** A comparison of methods for calculating DNA double-strand break induction frequency in mammalian cells by pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Radiat. Biol.* 65:641-649.

- Rydbberg, B. and Lindahl, T. 1982.** Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionine is a potentially mutagenic reaction. *EMBO J.*, 1, 211-216.
- Salic, A. and T. J. Mitchison. 2008.** A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105:2415-2420.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989.** Molecular cloning, a laboratory manual. CSH Press, New York, 2. Auflage.
- Sancar, A. 1996.** DNA excision repair. *Annu. Rev. Biochem.* 65:43-81.
- Sancar, A., L. A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kacmaz and S. Linn. 2004.** Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 73:39-85.
- Santamaria, D. and S. Ortega. 2006.** Cyclins and CDKS in development and cancer: lessons from genetically modified mice. *Front Biosci.* 11:1164-1188.
- Sartori, A. A., C. Lukas, J. Coates, M. Mistrik, S. Fu, J. Bartek, R. Baer, J. Lukas and S. P. Jackson. 2007.** Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* 450:509-514.
- Savitsky, K., S. Sfez, D. A. Tagle, Y. Ziv, A. Sarti, F. S. Collins, Y. Shiloh and G. Rotman. 1995.** The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum. Mol. Genet.*, 4, 2025-2032.
- Schmidt-Rose, T., D. Pollet, K. Will, J. Bergemann and K. P. Wittern. 1999.** Analysis of UV-B-induced DNA damage and its repair in heat-shocked skin cells. *J. Photochem. Photobiol. B* 53:144-152.
- Schrader, C. E., E. K. Linehan, S. N. Mochegova, R. T. Woodland and J. Stavnezer. 2005.** Inducible DNA breaks in Ig S regions are dependent on AID and UNG. *J. Exp. Med.*, 202, 561-568.
- Schultz, L. B., N. H. Chehab, A. Malikzay and T. D. Halazonetis. 2000.** p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.* 151:1381-1390.
- Sengupta, S. and C. C. Harris. 2005.** p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 44-55.
- Sharma, G. G., A. Gupta, H. Wang, H. Scherthan, S. Dhar, V. Gandhi, G. Iliakis, J. W. Shay, C. S. Young and T. K. Pandita. 2003.** hTERT associates with human telomeres and enhances genomic stability and DNA repair. *Oncogene* 22:131-146.
- Shechter, D., V. Costanzo and J. Gautier. 2004.** Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates. *DNA Repair (Amst)* 3:901-908.
- Sherr, C. J. 1995.** D-type cyclins. *Trends Biochem. Sci.* 20:187-190.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts. 1999.** CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13:1501-1512.
- Shiloh, Y. 2001.** ATM (ataxia telangiectasia mutated): expanding roles in the DNA damage response and cellular homeostasis. *Biochem. Soc. Trans.*, 29, 661-666.
- Shiloh, Y. and M. B. Kastan. 2001.** ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. *Adv. Cancer Res.* 83:209-254.
- Shiloh, Y. 2003.** ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer* 3:155-168.
- Shiloh, Y. 2006.** The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem. Sci.* 31:402-410.
- Shimomura, O., F. H. Johnson and Y. Saiga. 1962.** Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J. Cell Comp Physiol* 59:223-239.
- Shuck, S. C., E. A. Short and J. J. Turchi. 2008.** Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res.* 18:64-72.
- Siliciano, J. D., C. E. Canman, Y. Taya, K. Sakaguchi, E. Appella and M. B. Kastan. 1997.** DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev.* 11:3471-3481.
- Sinha, R. P. and D. P. Hader. 2002.** UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1:225-236.
- Sisken, J.E. and L. Morasca. 1965.** Intrapopulation kinetics of the mitotic cycle. *J. Cell Biol.*, 25, 179-189.
- Sorensen, C. S., R. G. Syljuasen, J. Falck, T. Schroeder, L. Ronnstrand, K. K. Khanna, B. B. Zhou, J. Bartek and J. Lukas. 2003.** Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* 3:247-258.
- Stiff, T., M. O'Driscoll, N. Rief, K. Iwabuchi, M. Lobrich and P. A. Jeggo. 2004.** ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* 64:2390-2396.

- Stiff, T., S. A. Walker, K. Cerosaletti, A. A. Goodarzi, E. Petermann, P. Concannon, M. O'Driscoll and P. A. Jeggo. 2006.** ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *EMBO J.* 25:5775-5782.
- Stiff, T., K. Cerosaletti, P. Concannon, M. O'Driscoll and P. A. Jeggo. 2008.** Replication independent ATR signalling leads to G2/M arrest requiring Nbs1, 53BP1 and MDC1. *Hum. Mol. Genet.* 17:3247-3253.
- Strumberg, D., A. A. Pilon, M. Smith, R. Hickey, L. Malkas and Y. Pommier. 2000.** Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff. *Mol. Cell Biol.* 20:3977-3987.
- Stucki, M., J. A. Clapperton, D. Mohammad, M. B. Yaffe, S. J. Smerdon and S. P. Jackson. 2005.** MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123:1213-1226.
- Sugasawa, K. 2009.** UV-DDB: a molecular machine linking DNA repair with ubiquitination. *DNA Repair (Amst)* 8:969-972.
- Sugiyama, T. and S. C. Kowalczykowski. 2002.** Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation. *J. Biol. Chem.* 277:31663-31672.
- Sung, P. and H. Klein. 2006.** Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:739-750.
- Suzuki, K., M. Yamauchi, Y. Oka, M. Suzuki and S. Yamashita. 2010.** A novel and simple micro-irradiation technique for creating localized DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.*
- Suzuki, M., K. Suzuki, S. Kodama and M. Watanabe. 2006.** Interstitial chromatin alteration causes persistent p53 activation involved in the radiation-induced senescence-like growth arrest. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340:145-150.
- Syljuåsen, R. G., B. Krolewski and J. B. Little. 1999.** Loss of normal G1 checkpoint control is an early step in carcinogenesis, independent of p53 status. *Cancer Res.* 59:1008-1014.
- Szak, S. T., D. Mays and J. A. Pietsenpol. 2001.** Kinetics of p53 binding to promoter sites in vivo. *Mol. Cell Biol.* 21:3375-3386.
- Taylor, W. R. and G. R. Stark. 2001.** Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20:1803-1815.
- Therrien, J. P., R. Drouin, C. Baril and E. A. Drobetsky. 1999.** Human cells compromised for p53 function exhibit defective global and transcription-coupled nucleotide excision repair, whereas cells compromised for pRb function are defective only in global repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:15038-15043.
- Thomas, D. C., J. D. Roberts and T. A. Kunkel. 1991.** Heteroduplex repair in extracts of human HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 266:3744-3751.
- Tibbetts, R. S., D. Cortez, K. M. Brumbaugh, R. Scully, D. Livingston, S. J. Elledge and R. T. Abraham. 2000.** Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev.* 14:2989-3002.
- Ting, N. S. and W. H. Lee. 2004.** The DNA double-strand break response pathway: becoming more BRCAish than ever. *DNA Repair (Amst)* 3:935-944.
- Tipler, P. A. 1994.** Physik. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- Tobias, F., M. Durante, G. Taucher-Scholz and B. Jakob. 2010.** Spatiotemporal analysis of DNA repair using charged particle radiation. *Mutat. Res.* 704:54-60.
- Tyrrell, R. M. 1991.** Oxidants and Antioxidants (Sies, H.,ed) pp. 57-83, Academic Press, Ltd., London
- Unsal-Kacmaz, K. and A. Sancar. 2004.** Quaternary structure of ATR and effects of ATRIP and replication protein A on its DNA binding and kinase activities. *Mol. Cell Biol.* 24:1292-1300.
- Unsal-Kacmaz, K., T. E. Mullen, W. K. Kaufmann and A. Sancar. 2005.** Coupling of human circadian and cell cycles by the timeless protein. *Mol. Cell Biol.* 25:3109-3116.
- Unsal-Kacmaz, K., P. D. Chastain, P. P. Qu, P. Minoo, M. Cordeiro-Stone, A. Sancar and W. K. Kaufmann. 2007.** The human Tim/Tipin complex coordinates an Intra-S checkpoint response to UV that slows replication fork displacement. *Mol. Cell Biol.* 27:3131-3142.
- Ura, K. and J. J. Hayes. 2002.** Nucleotide excision repair and chromatin remodeling. *Eur. J. Biochem.* 269:2288-2293.
- van Attikum, H. and S. M. Gasser. 2009.** Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol.*, 19, 207-217.
- van den Heuvel, H. S. and E. Harlow. 1993.** Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* 262:2050-2054.

- van der Leun, J. C. 2004.** The ozone layer. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 20:159-162.
- van Heemst, D., L. Brugmans, N. S. Verkaik and D. C. van Gent. 2004.** End-joining of blunt DNA double-strand breaks in mammalian fibroblasts is precise and requires DNA-PK and XRCC4. *DNA Repair (Amst)* 3:43-50.
- Venema, J., A. van Hoffen, A. T. Natarajan, A. A. van Zeeland and L. H. Mullenders. 1990.** The residual repair capacity of xeroderma pigmentosum complementation group C fibroblasts is highly specific for transcriptionally active DNA. *Nucleic Acids Res.* 18:443-448.
- Vermeulen, K., D. R. Van Bockstaele and Z. N. Berneman. 2003.** The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 36:131-149.
- Vilenchik, M. M. and A. G. Knudson, Jr. 2000.** Inverse radiation dose-rate effects on somatic and germ-line mutations and DNA damage rates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:5381-5386.
- Vilenchik, M. M. and A. G. Knudson. 2003.** Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:12871-12876.
- Volker, M., M. J. Mone, P. Karmakar, A. van Hoffen, W. Schul, W. Vermeulen, J. H. Hoeijmakers, R. van Driel, A. A. van Zeeland and L. H. Mullenders. 2001.** Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol. Cell* 8:213-224.
- Wahl, G. M., S. P. Linke, T. G. Paulson and L. C. Huang. 1997.** Maintaining genetic stability through TP53 mediated checkpoint control. *Cancer Surv.* 29:183-219.
- Walker, J. R., R. A. Corpina and J. Goldberg. 2001.** Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412:607-614.
- Wang, B., S. Matsuoka, P. B. Carpenter and S. J. Elledge. 2002.** 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science* 298:1435-1438.
- Wang, H., Z. C. Zeng, T. A. Bui, E. Sonoda, M. Takata, S. Takeda and G. Iliakis. 2001.** Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the RAD52 epistasis group. *Oncogene* 20:2212-2224.
- Wang, H., M. Wang, H. Wang, W. Bocker and G. Iliakis. 2005.** Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors. *J. Cell Physiol* 202:492-502.
- Wang, X. Q., J. L. Redpath, S. T. Fan and E. J. Stanbridge. 2006.** ATR dependent activation of Chk2. *J. Cell Physiol* 208:613-619.
- Wang, Y. and C. Prives. 1995.** Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. *Nature* 376:88-91.
- Ward, I. M. and J. Chen. 2001.** Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J. Biol. Chem.* 276:47759-47762.
- Ward, I. M., K. Minn and J. Chen. 2004.** UV-induced ataxia-telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR) activation requires replication stress. *J. Biol. Chem.* 279:9677-9680.
- Ward, J. F. 1985.** Biochemistry of DNA lesions. *Radiat. Res. Suppl* 8:S103-S111.
- Ward, J. F. 1988.** DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 35:95-125.
- Ward, J. F. 1990.** The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: a review. *Int. J. Radiat. Biol.* 57:1141-1150.
- Warmerdam, D. O. and R. Kanaar. 2010.** Dealing with DNA damage: Relationships between checkpoint and repair pathways. *Mutat. Res.* 704:2-11.
- Wei, Y. H. 1998.** Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217:53-63.
- West, M. H. and W. M. Bonner. 1980.** Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry* 19:3238-3245.
- Weterings, E. and D. C. van Gent. 2004.** The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis. *DNA Repair (Amst)* 3:1425-1435.
- Weterings, E. and D. J. Chen. 2008.** The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res.* 18:114-124.
- Wilson, W. D., F. A. Tanious, H. J. Barton, R. L. Jones, K. Fox, R. L. Wydra and L. Strekowski. 1990.** DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Biochemistry*, 29, 8452-8461.

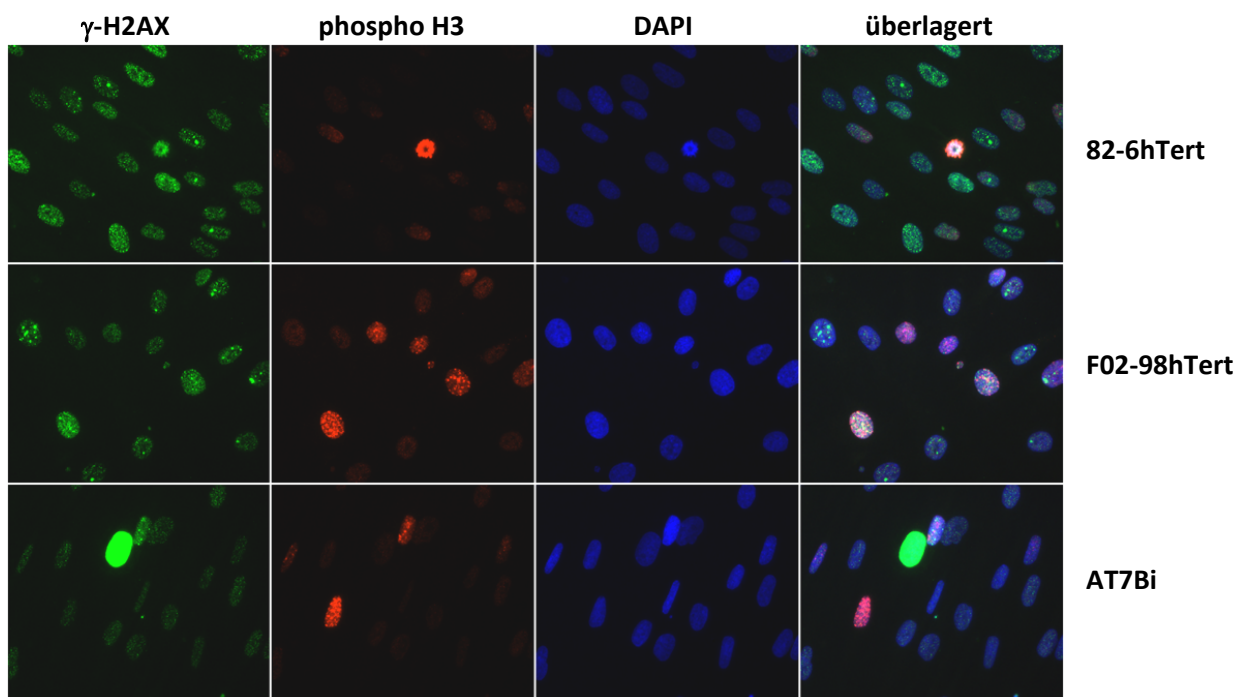
- Wood, R. D., M. Mitchell, J. Sgouros and T. Lindahl. 2001.** Human DNA repair genes. *Science* 291:1284-1289.
- Wright, J. A., K. S. Keegan, D. R. Herendeen, N. J. Bentley, A. M. Carr, M. F. Hoekstra and P. Concannon. 1998.** Protein kinase mutants of human ATR increase sensitivity to UV and ionizing radiation and abrogate cell cycle checkpoint control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:7445-7450.
- Wyman, C. and M. Botchan. 1995.** DNA replication. A familiar ring to DNA polymerase processivity. *Curr. Biol.* 5:334-337.
- Wyman, C. and R. Kanaar. 2006.** DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu. Rev. Genet.* 40:363-383.
- Xu, B., S. T. Kim, D. S. Lim and M. B. Kastan. 2002.** Two molecularly distinct G(2)/M checkpoints are induced by ionizing irradiation. *Mol. Cell Biol.* 22:1049-1059.
- Yamauchi, M., Y. Oka, M. Yamamoto, K. Niimura, M. Uchida, S. Kodama, M. Watanabe, I. Sekine, S. Yamashita and K. Suzuki. 2008.** Growth of persistent foci of DNA damage checkpoint factors is essential for amplification of G1 checkpoint signaling. *DNA Repair (Amst)* 7:405-417.
- Yan, Y., C. P. Black and K. H. Cowan. 2007.** Irradiation-induced G2/M checkpoint response requires ERK1/2 activation. *Oncogene* 26:4689-4698.
- Yang, H., P. D. Jeffrey, J. Miller, E. Kinnucan, Y. Sun, N. H. Thoma, N. Zheng, P. L. Chen, W. H. Lee and N. P. Pavletich. 2002.** BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science* 297:1837-1848.
- Yano, K., K. Morotomi-Yano and H. Akiyama. 2009.** Cernunnos/XLF: a new player in DNA double-strand break repair. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41:1237-1240.
- Zetterberg, A., O. Larsson and K. G. Wiman. 1995.** What is the restriction point? *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:835-842.
- Zha, S., C. Boboila and F.W. Alt. 2009.** Mre11: roles in DNA repair beyond homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 16, 798-800.
- Zhan, Q., F. Carrier and A. J. Fornace, Jr. 1993.** Induction of cellular p53 activity by DNA-damaging agents and growth arrest. *Mol. Cell Biol.* 13:4242-4250.
- Zhang, Y., J. Zhou, X. Cao, Q. Zhang, C. U. Lim, R. L. Ullrich, S. M. Bailey and H. L. Liber. 2007.** Partial deficiency of DNA-PKcs increases ionizing radiation-induced mutagenesis and telomere instability in human cells. *Cancer Lett.* 250:63-73.
- Zhao, H., J. L. Watkins and H. Piwnica-Worms. 2002.** Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:14795-14800.
- Zhao, H., F. Traganos and Z. Darzynkiewicz. 2010.** Kinetics of the UV-induced DNA damage response in relation to cell cycle phase. Correlation with DNA replication. *Cytometry A* 77:285-293.
- Zhou, T., J. W. Chou, D. A. Simpson, Y. Zhou, T. E. Mullen, M. Medeiros, P. R. Bushel, R. S. Paules, X. Yang, P. Hurban, E. K. Lobenhofer and W. K. Kaufmann. 2006.** Profiles of global gene expression in ionizing-radiation-damaged human diploid fibroblasts reveal synchronization behind the G1 checkpoint in a G0-like state of quiescence. *Environ. Health Perspect.* 114:553-559.
- Zou, L., D. Liu and S. J. Elledge. 2003.** Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:13827-13832.
- Zou, L. and S. J. Elledge. 2003.** Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300:1542-1548.

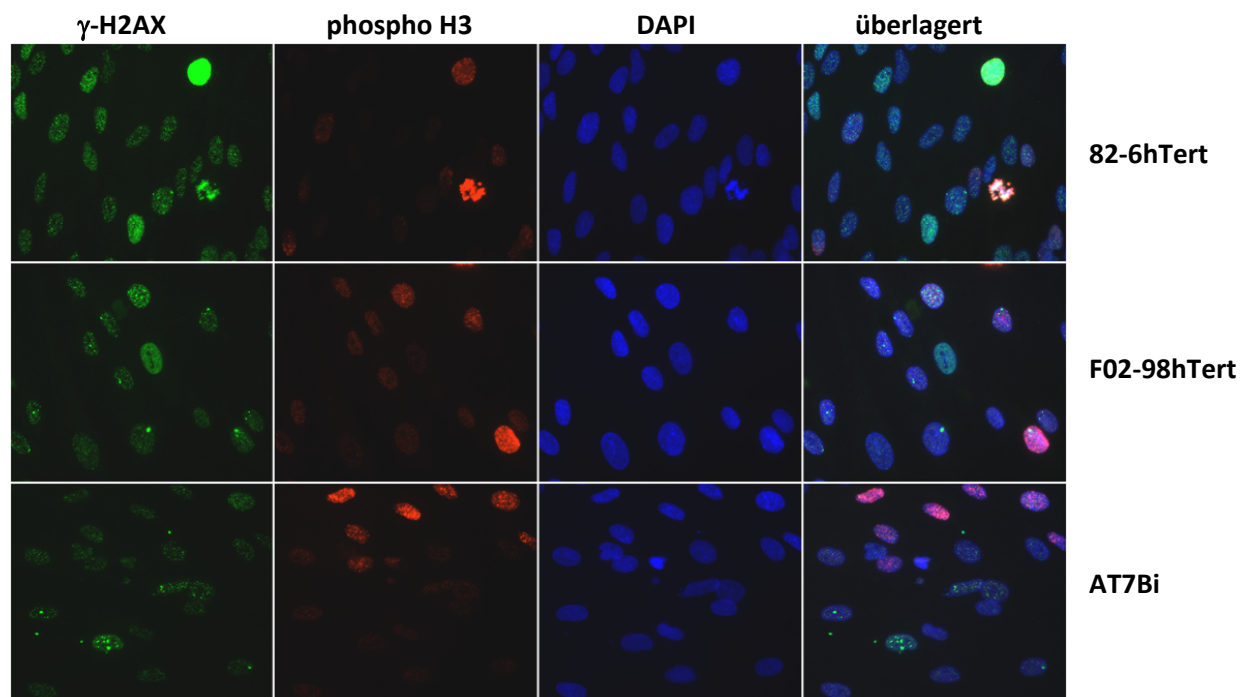
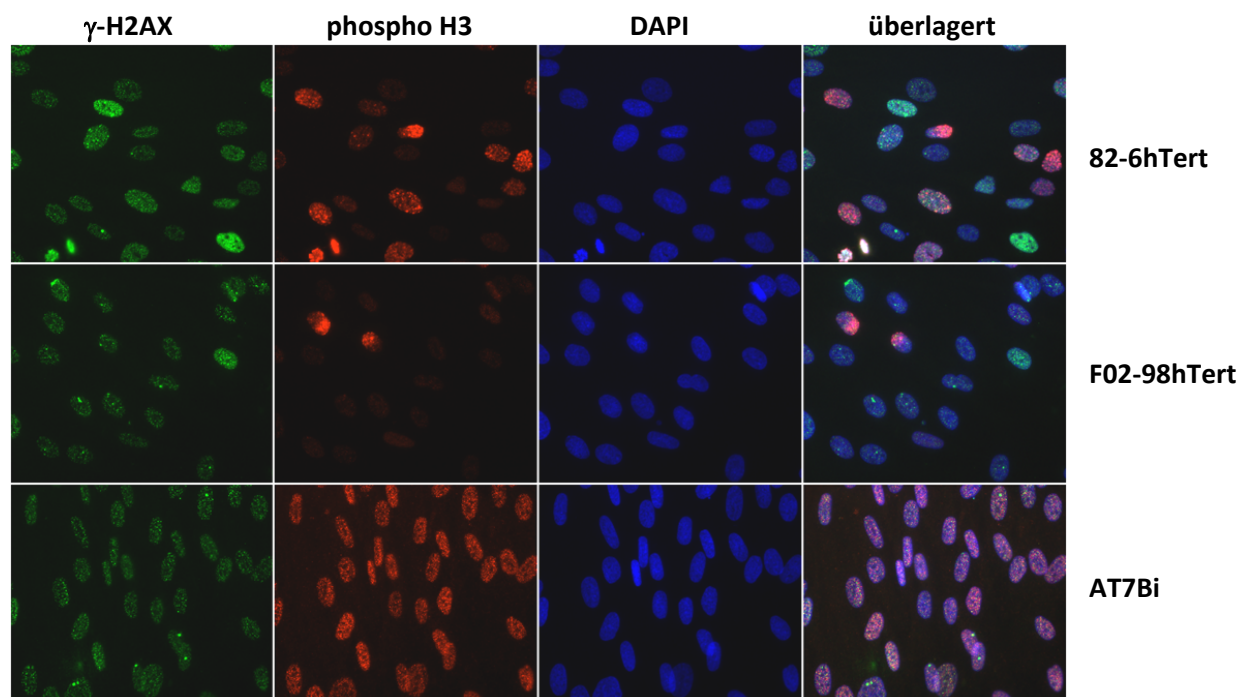
7 Anhang

Zu Kapitel 4.4.9: Bedeutung von γ -H2AX im Zusammenhang mit ATM und ATR und dessen Check-point-Funktion nach UVC-Bestrahlung

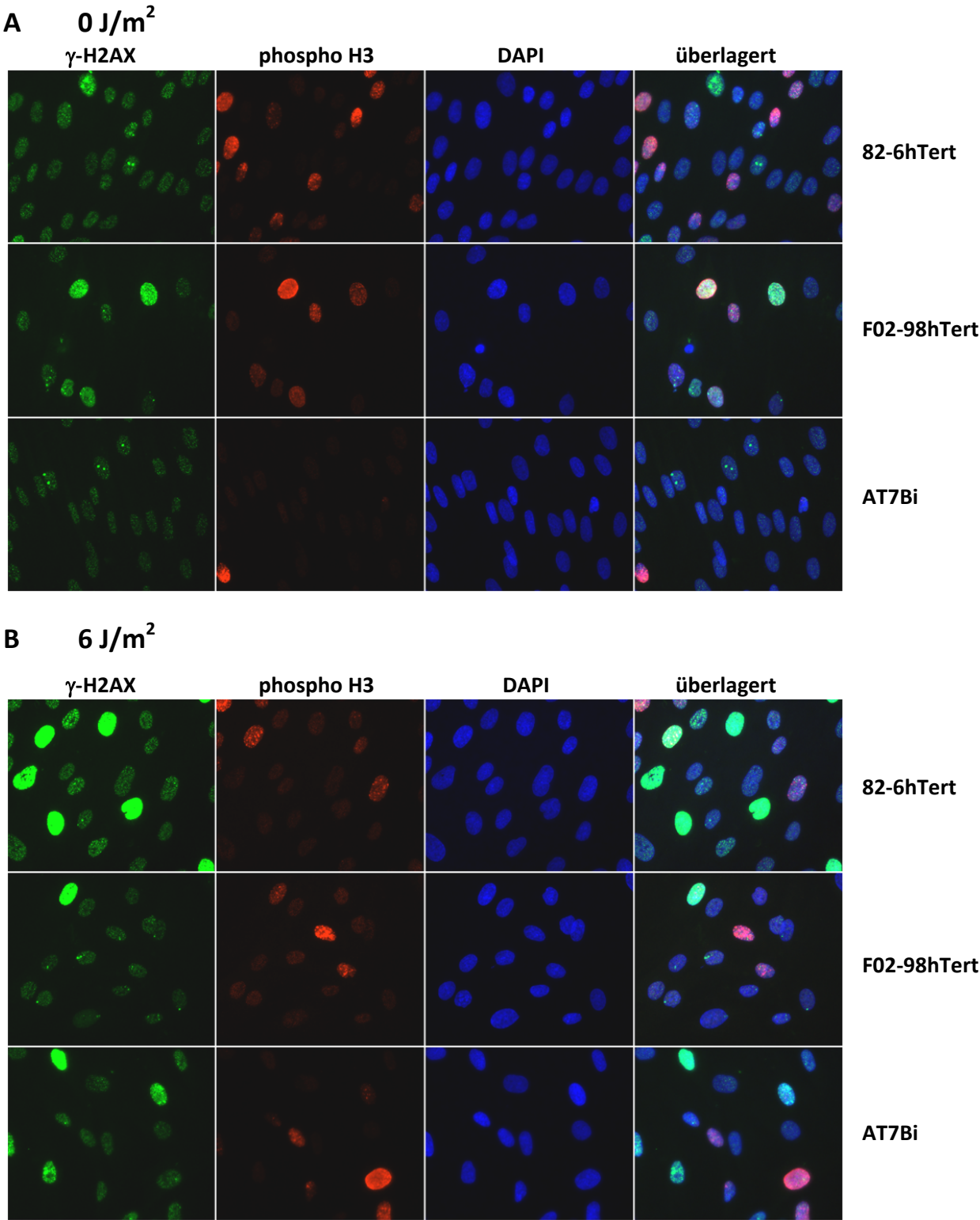
Die folgenden Bildausschnitte zeigen Übersichtsbilder fixierter, asynchroner Zellkulturen von 82-6hTert-, F02-98hTert- und AT7Bi-Zellen. Die Zellen wurden unbestrahlt belassen, mit 6 J/m^2 oder 12 J/m^2 bestrahlt und entweder sofort nach Bestrahlung (Abb. 55) oder 2 h nach Bestrahlung (Abb. 56) fixiert. DSBs wurden mit γ -H2AX-Primärantikörper und FITC-gekoppeltem Sekundärantikörper (grün) nachgewiesen. Zellen der G2-Phase wurden über Färbung mit einem Primärantikörper gegen anti-phospho Histone H3 (Ser 10) und rotem Sekundärantikörper identifiziert. Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Die Übersichtsbilder wurden in 400-facher Vergrößerung aufgenommen und bestehen aus mehreren Ebenen. Alle Bilder der jeweiligen Färbung wurden mit der gleichen Belichtungszeit aufgenommen. Nach Bestrahlung und sofortiger Fixierung war keine deutlich Zunahme an γ -H2AX-Foci, weder in G2-Phase-Zellen noch in den übrigen Zellzyklus-Phasen zu erkennen, auch die Anzahl von Zellen mit einem flächigen Signal nahm nicht signifikant zu. Bei Fixierung der Zellen 2 h nach Bestrahlung konnte eine Zunahme von Zellen mit einer flächigen Phosphorylierung von H2AX (pannukleäres Signal) beobachtet werden. Diese Zellen entsprechen Zellen der G1- und G2-Phase. Zellen mit Zunahme an γ -H2AX-Foci konnten auch nach der längeren Reparaturzeit von 2 h nicht detektiert werden.

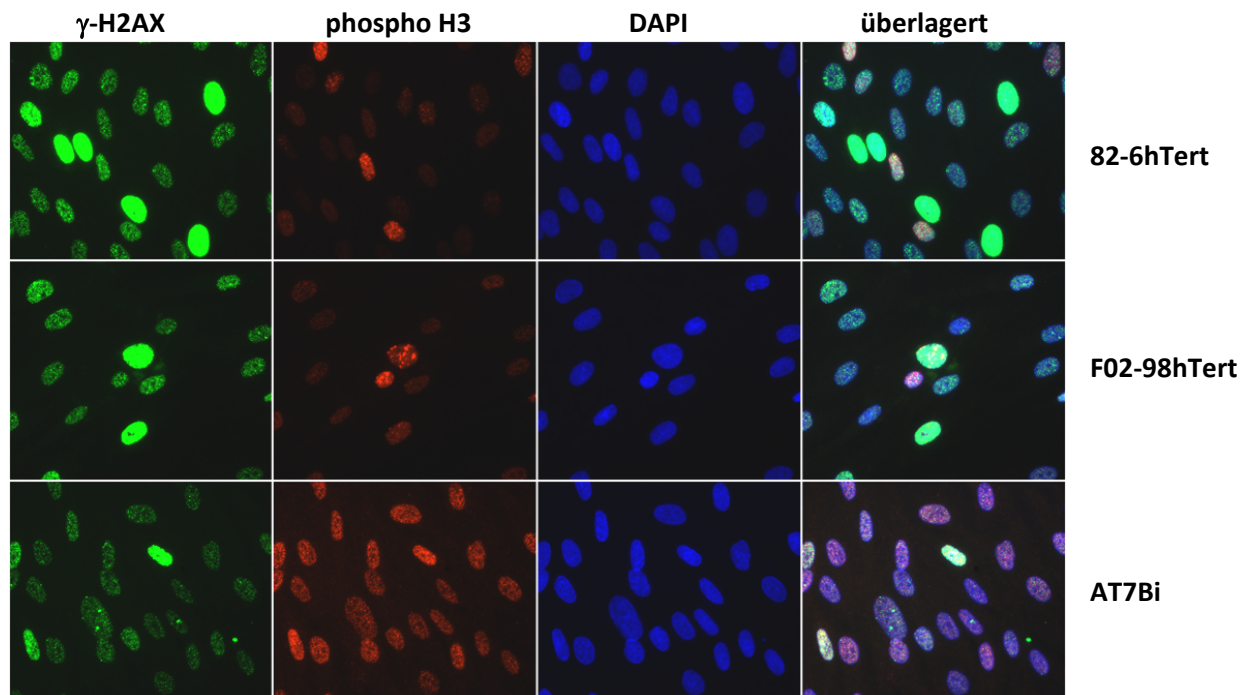
A 0 J/m^2



B 6 J/m^2 **C** 12 J/m^2 **Abb. 55: Übersichtsbilder der γ -H2AX Phosphorylierung nach 0 h**

Exponentiell wachsende Zellen der Zelllinien 82-6hTert, F02-98hTert und AT7Bi wurden zur Kontrolle unbestrahlt belassen (A) oder mit 6 J/m^2 (B) und 12 J/m^2 (C) bestrahlt. Sofort nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und eine Färbung gegen γ -H2AX und phospho H3 durchgeführt. Der polyklonale anti-phospho H3 Antikörper erkennt nicht nur spezifisch Zellen während der Mitose, auch Zellen in der G2-Phase werden erkannt. Die Färbung fällt hier schwächer aus als in mitotischen Zellen. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Übersichtsbilder wurden in 400-facher Vergrößerung und gleicher Belichtungszeit der jeweiligen Färbung aufgenommen.



C **12 J/m²****Abb. 56: Übersichtsbilder der γ -H2AX Phosphorylierung nach 2 h**

Exponentiell wachsende Zellen der Zelllinien 82-6hTert, F02-98hTert und AT7Bi wurden zur Kontrolle unbestrahlt belassen (A) oder mit (B) 6 J/m² und (C) 12 J/m² bestrahlt. 2 h nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und eine Färbung gegen γ -H2AX und phospho H3 durchgeführt. Der polyklonale anti-Histon H3 Antikörper erkennt nicht nur spezifisch Zellen während der Mitose, auch Zellen in der G2-Phase werden erkannt. Die Färbung fällt hier schwächer aus als in mitotischen Zellen. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die Übersichtsbilder in 400-facher Vergrößerung und gleicher Belichtungszeit der jeweiligen Färbung aufgenommen.

Zu Kapitel 4.4.6: γ -H2AX-Signal in synchronisierten G1-Phase-Zellen nach UVC-Bestrahlung

Die Bildausschnitte zeigen Übersichtsbilder fixierter, in der G1-Phase synchronisierter Zellen von 82-6hTert. Zeitgleich zur Stimulation mit FCS wurde zur Markierung von S-Phase-Zellen EdU ins Medium gegeben. Die Zellen wurden entweder nicht bestrahlt und fixiert oder mit 12 J/m² bestrahlt und nach 18 h fixiert. DSBs wurden mit γ -H2AX-Primärantikörper und FITC-gekoppeltem Sekundärantikörper (grün) nachgewiesen. Zellen der S-Phase wurden über Färbung mit Alexa Fluor 594 (rot) des Click-iT™ Kits (Invitrogen) detektiert. Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt. Die einzelnen Färbungen wurden in dieser Darstellung überlagert. Die Übersichtsbilder selbst bestehen aus 9 Einzelbildern, wovon jedes in 400-facher Vergrößerung aufgenommen wurde und aus mehreren Ebenen besteht. Alle Bilder der jeweiligen Färbung wurden mit der gleichen Belichtungszeit aufgenommen. In unbestrahlten Zellen und Fixierung nach 15 min war in vielen Zellen kein γ -H2AX-Focus, in wenigen Zellen 1 bis 4 Foci zu erkennen. 1 Zelle zeigte ein etwas stärkeres pannukleäres Signal, wenige Zellen konnten als S-Phase positiv (rot) gewertet werden.

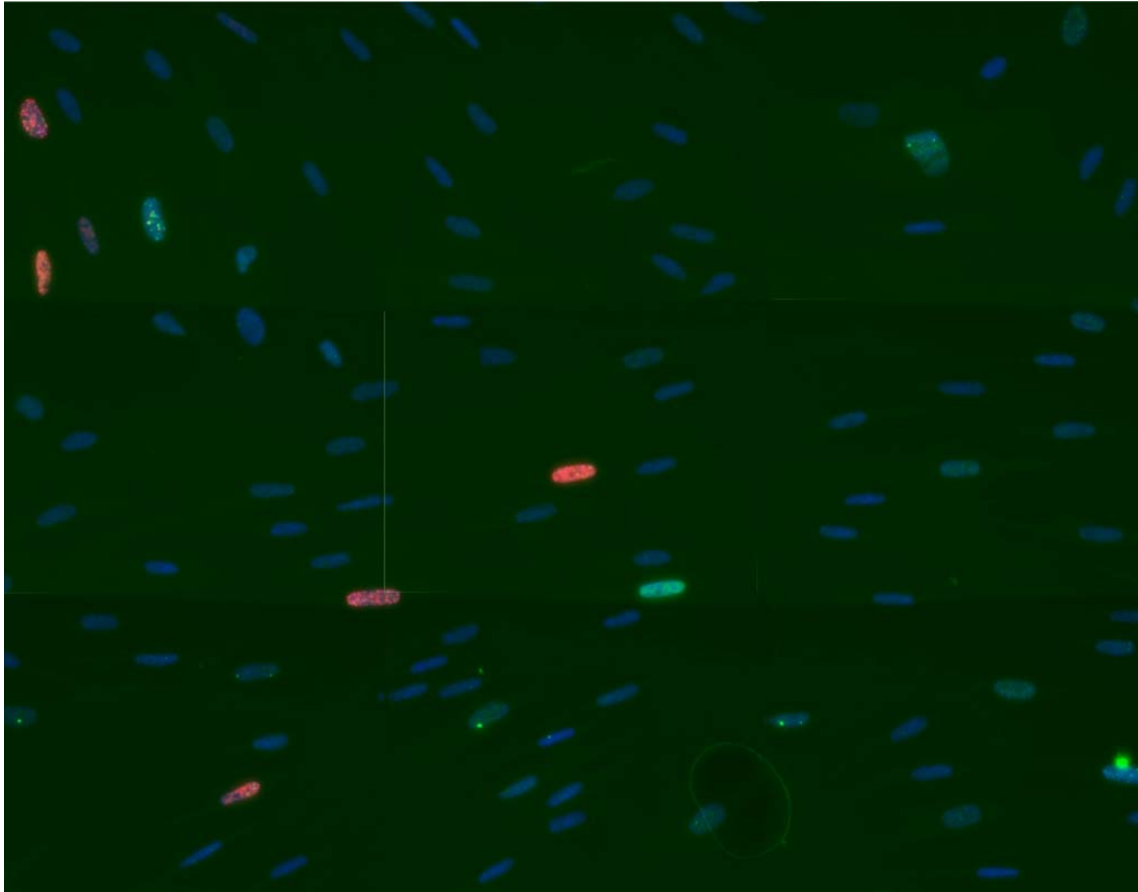


Abb. 57: Übersichtsbild einer unbestrahlten Kultur von 82-6hTert-Zellen

Eine in der G1-Phase synchronisierte Kultur von 82-6hTert-Zellen wurde zeitgleich mit FCS und EdU zum Medium gegeben, um Zellen, welche im Verlauf des Experiments in die S-Phase gelangten, zu markieren. Die Zellen wurden zum Zeitpunkt 45 min nach Stimulation fixiert. Die Bilder wurden in 400-facher Vergrößerung aufgenommen. Für die jeweiligen Färbungen wurden dieselben Belichtungszeiten gewählt.

Nach Bestrahlung der 82-6hTert-Zellen mit 12 J/m^2 und Fixierung nach 18 h konnten mehr G1-Phase-Zellen mit stärkerem und leichterem pannukleärem Signal als bei der unbestrahlten Probe nach sofortiger Fixierung detektiert werden. In einzelnen Zellen der G1-Phase waren γ -H2AX-Foci zu erkennen, die Anzahl der Foci war allerdings im Vergleich zu unbestrahlten Zellen kaum erhöht und bewegte sich zwischen 1 und 4 Foci. 18 h nach Bestrahlung waren mehr Zellen S-Phase-positiv (rot), Zellen, die S-Phase-positiv waren und gleichzeitig ein sehr starkes pannukleäres Signal (grün) zeigten, wurden in dieser Überlagerung gelb dargestellt.

Die WT-Zellen der Zelllinie 82-6hTert dienten als Beispiel, in Zellen der Zelllinie AT7Bi konnten ähnliche Verhältnisse nach Bestrahlung von Zellen mit Foci und Zellen mit pannukleärem Signal gefunden werden. Die Anzahl der Zellen mit pannukleärem Signal in F02-98hTert Zellen war im Gegensatz zu den zuvor genannten Zelllinien verringert.

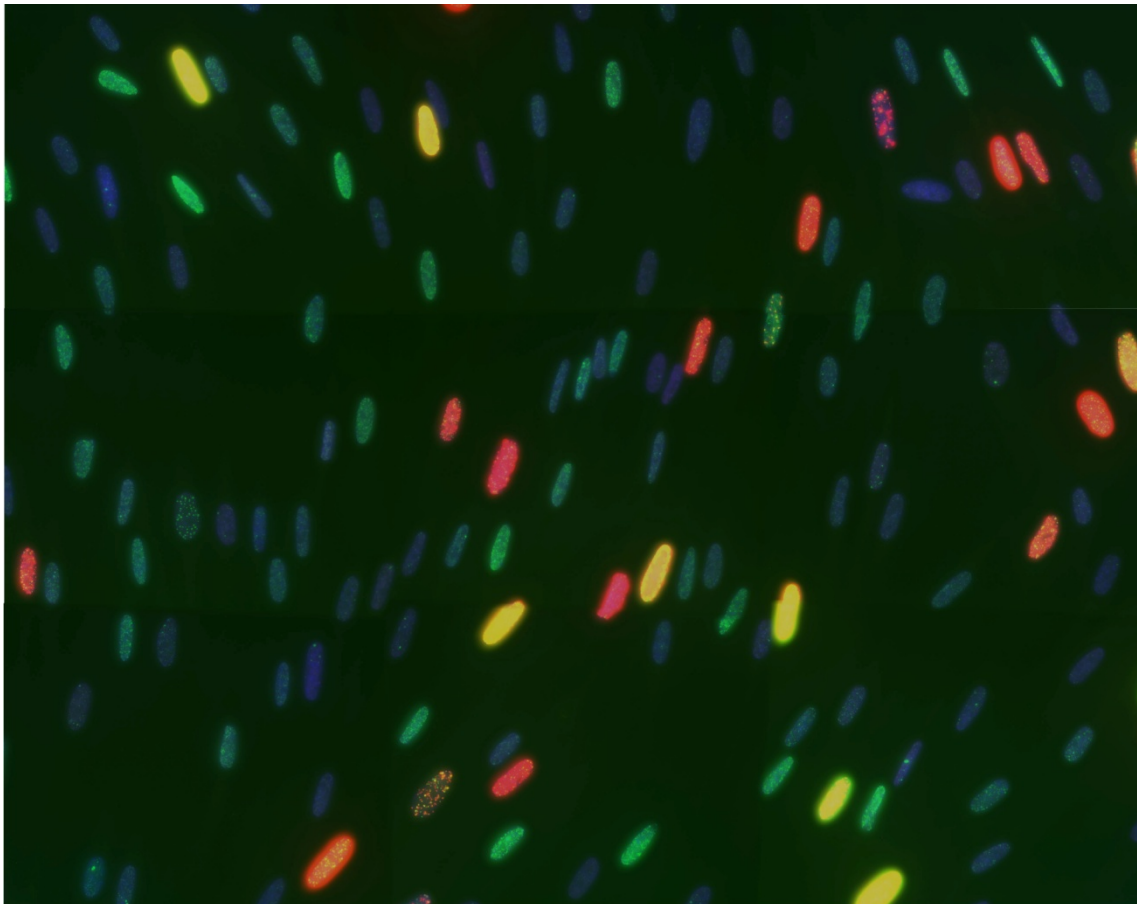


Abb. 58: Übersichtsbild einer mit UVC bestrahlten Kultur von 82-6hTert-Zellen

Eine in der G1-Phase synchronisierte Kultur von 82-6hTert-Zellen wurde 30 min vor Bestrahlung mit 12 J/m^2 zeitgleich mit FCS stimuliert und EdU zum Medium gegeben, um Zellen, welche im Verlauf des Experiments in die S-Phase gelangten, zu markieren. Die Zellen wurden zum Zeitpunkt 18 h nach Bestrahlung fixiert. Die Bilder wurden in 400-facher Vergrößerung aufgenommen. Für die jeweiligen Färbungen wurden dieselben Belichtungszeiten gewählt.

8 Lebenslauf

Name: Barbara Koch
Geburtsdatum: 27.12.1978
Geburtsort: Neustadt an der Weinstraße
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schul- und Berufsausbildung:

September 1985 - Juli 1989: Grundschule Frankenstein
August 1989 - Juni 1998: St. Franziskus-Gymnasium Kaiserslautern
Juni 1998: Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
August 1998 - Juni 2001: Ausbildung zur Biologielaborantin bei Knoll GmbH Ludwigshafen

Studium:

Oktober 2001 - März 2006: Studium der Biologie an der Technischen Universität Kaiserslautern
März 2006: Abschluss des Biologiestudiums mit Diplom

Beruflicher Werdegang:

Juni 2001 - September 2001: Labormitarbeiterin bei Knoll GmbH Ludwigshafen
April 2006 - Dezember 2007: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biophysik der Universität des Saarlandes, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Markus Löbrich
Januar 2008 - November 2010: Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Strahlenbiologie und DNA-Reparatur der Technischen Universität Darmstadt, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Markus Löbrich

9 Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Deckbar D, Stiff T, Koch B, Reis C, Löbrich M, Jeggo PA

The limitations of the G1-S checkpoint
Cancer Res. 2010 Jun 1;70(11):4412-21.

Tagungsbeiträge

Barbara Koch, Eik Schumann, Rudolf Drescher, Markus Löbrich (2007)

„Checkpoint-Messung in lebenden Zellen“

Vortrag, 10. Jahrestagung 2007 der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V. GBS, Mainz

Barbara Koch, Dorothee Deckbar, Markus Löbrich (2008)

„Untersuchungen zum G1/S-Checkpoint nach ionisierender Bestrahlung mittels Lebendzellmikroskopie“

Vortrag, 11. Jahrestagung 2008 der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V. GBS, Tübingen

Barbara Koch, Eik Schumann, Dorothee Deckbar, Tom Stiff, Penny Jeggo und Markus Löbrich (2009)

„The interplay of DSB repair and checkpoint control in living cells“

Vortrag, 2nd German-French DNA Repair Meeting 2009, Deutsche Gesellschaft für DNA-Reparaturforschung DGDR, Konstanz

Reisestipendien

Reisestipendium anlässlich der Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V. GBS, Mainz 2007

Reisestipendium anlässlich der Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V. GBS, Tübingen 2008

Reisestipendium anlässlich des 2nd German-French DNA Repair Meeting der Deutschen Gesellschaft für DNA-Reparaturforschung DGDR, Konstanz 2009

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Markus Löbrich für die Möglichkeit bedanken, ein interessantes Thema in seiner Arbeitsgruppe bearbeiten zu können. Weiter danke ich ihm für seine Diskussionsbereitschaft, seine Unterstützung und seine Ideen, welche die Arbeit stets voranbrachten.

Herrn Prof. Dr. Heribert Warzecha danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Adam Bertl und Herrn Prof. Dr. Norbert Dencher für die Bereitschaft, die Arbeit zu prüfen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Dorothee Deckbar für die gute und umfassende Betreuung, die schnelle und ausführliche Korrektur meiner Arbeit, die stete Gesprächsbereitschaft - und nicht zuletzt für die aufbauenden Worte in allen Lebenslagen.

Bei Herrn Dr. Rudolf Drescher bedanke ich mich ganz herzlich für die Betreuung zu Beginn meiner Arbeit und die vielen Tipps beim Klonieren.

Für die experimentelle Unterstützung bei der Anfertigung von Western Blots und allem, was dazu gehört, möchte ich mich bei Dr. Steffen Naumann bedanken.

Zudem bedanke ich mich bei Herrn Dr. Alexander Rapp für die wertvollen Ratschläge bei den ersten Gehversuchen mit UV-Bestrahlung und bei der AG Cardoso für die Nutzung des Crosslinkers.

Bei der gesamten AG Löbrich möchte ich mich für die freundschaftliche, lustige Atmosphäre und vor allem den Zusammenhalt bedanken.

Einen herzlichen Dank möchte ich auch allen Korrekturlesern aussprechen.

Meinen Eltern, meinen Großeltern, meiner Schwester und meinem Freund Markus gebührt das größte Dankeschön – für die verlässliche Unterstützung, das Interesse an meiner Arbeit und den großen Rückhalt, den sie mir immer gegeben haben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Darmstadt, 07.10.2010

(Barbara Koch)